

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Localisation subcellulaire et fonction de la maspardine, la protéine déficiente dans la Paraplégie Spastique 21 (SPG21)

Paul, Melody

*Award date:*  
2018

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**Faculté des Sciences**

**Localisation subcellulaire et fonction de la maspardine,  
la protéine déficiente dans la Paraplégie Spastique 21 (SPG21)**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de Master 120 de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire**  
Melody PAUL  
Août 2018



## Localisation subcellulaire et fonction de la maspardine, la protéine déficiente dans la Paraplégie Spastique 21 (SPG21)

PAUL Melody

### Résumé

Une déficience de la maspardine cause la Paraplégie Spastique 21 (SPG21), ou syndrome de Mast, une forme autosomique récessive compliquée de paraplégie spastique héréditaire. Cette maladie provoque l'apparition de différents symptômes liés à une dégénérescence des neurones corticospinaux, tels qu'une spasticité ou une ataxie.

Des observations réalisées lors d'une étude antérieure ont mis en évidence que cette protéine se localise en partie au niveau des lysosomes dans le foie de rat tout comme cinq autres protéines mutées dans des paraplégies spastiques héréditaires. Plusieurs de ces protéines semblent jouer un rôle dans les fonctions lysosomales, notamment en participant au trafic des récepteurs de transport des hydrolases acides lysosomales. A ce jour, la fonction de la maspardine n'a cependant pas été élucidée.

Afin de contribuer à l'identification de cette fonction, nous avons tout d'abord analysé la localisation subcellulaire de la maspardine dans une lignée de cellules neuronales (SK-N-BE) à l'aide de fractionnements subcellulaire par centrifugation différentielle ou sur gradient de densité de Percoll. Nous avons ensuite évalué l'effet de différents traitements, impactant la morphologie et le fonctionnement normal des lysosomes, sur la localisation de la maspardine et l'expression de son gène, *SPG21*, dans les cellules HeLa. Ces traitements ont consisté, d'une part, à incuber des cellules HeLa avec du saccharose (une molécule qui est endocytée mais non dégradée dans les lysosomes) afin d'induire une surcharge lysosomale et, d'autre part, à soumettre les cellules à une période de jeûne. Pour terminer, nous avons utilisé des clones mutés pour le gène *SPG21* (avec un changement du cadre de lecture au début de l'exon 2) afin d'étudier l'impact de l'absence de maspardine sur l'expression protéique et génique de marqueurs lysosomaux et autophagiques.

Nos résultats montrent que le fractionnement complet par centrifugation différentielle et sur gradient de densité de Percoll permet une séparation efficace des différents compartiments subcellulaires dans les cellules SK-N-BE. En combinant les résultats obtenus par ces deux méthodes, nous déduisons que la maspardine présente une localisation double, cytosolique d'une part et probablement endolysosomale de l'autre.

Lors d'une surcharge lysosomale induite par l'exposition de cellules HeLa à une haute concentration de saccharose, la maspardine semble être recrutée sur les lysosomes car sa population lysosomale augmente au détriment de sa population cytosolique. Le contraire est observable lors d'une période de jeûne. Lors du traitement avec du saccharose, l'expression d'ARNm de quelques marqueurs lysosomaux semble légèrement augmenter mais aucune différence n'est visible pour l'expression de *SPG21*.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la maspardine est une protéine associée à la membrane des lysosomes, notamment dans les cellules neuronales, et que sa présence à ce niveau est modulée par des signaux tels que l'accumulation d'une molécule non dégradée ou la diminution de la disponibilité en nutriments. Il sera intéressant, dans le futur, d'analyser le lien potentiel entre la maspardine et TFEB, qui est un facteur de transcription central dans l'adaptation du métabolisme cellulaire en fonction de la disponibilité en nutriments.



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier M. Michel Jadot et Mme Marielle Boonen de m'avoir permis de réaliser mon stage de mémoire au sein de leur laboratoire et de m'avoir proposé tant d'idées intéressantes. Un grand merci également pour le temps qu'ils ont accordé aux réponses à mes questions et à la correction de ce mémoire.

Merci à vous deux, Virginie et Florentine, pour tout le temps que vous m'avez consacré tant dans les explications, les encouragements que les conseils. Merci également de m'avoir initiée à de nombreuses nouvelles techniques et pour votre patience dans la réalisation de celles-ci.

Merci à tous mes professeurs pour ces cinq années très enrichissantes.

Je remercie tous les membres du jury pour la lecture ainsi que pour l'évaluation de mon manuscrit.

Pour finir, je tiens à adresser un grand merci à mes amis et à ma famille. Particulièrement mes parents car sans eux tout ce parcours n'aurait pas été possible ainsi qu'Héloïse pour son soutien et sa patience.

## Liste des abréviations

$\alpha$ -gluc	$\alpha$ -glucosidase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALDH16A1	Aldéhyde déshydrogénase 16A1
AP	Protéine adaptatrice
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Arp	« Actin-related protéin », protéine associée à l'actine
ASR	Activité spécifique relative
ATG	« Autophagy-related », associé à l'autophagie
ATP	Adénosine triphosphate
$\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase
BMP	« Bone morphogenic protein », protéine morphogénique osseuse
CD-MPR	« Clathrin-dependent mannose-6-phosphate receptor », récepteur mannose-6-phosphate dépendant de la clathrine
CD4	Cluster de différenciation 4
CI-MPR	« Clathrin-independent mannose-6-phosphate receptor », récepteur mannose-6-phosphate indépendant de la clathrine
CLEAR	« Coordinated lysosomal expression and regulation »
COPI	« Coat protein complex I », complexe de protéines manteau I
CRISPR	« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »
CTSD	Cathepsine D
Cytox	Cytochrome C oxidase
DPPIII	Dipeptidyl amino-peptidase 3
EGF	« Epidermal growth factor », facteur de croissance épidermique
EGFR	« EGF receptor », récepteur à l'EGF
Eps15	« EGFR pathway substrate 15 », substrat de la voie liée à l'EGFR
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GGA	« Golgi-localized ADP-ribosylation factor binding protein », protéine de liaison du facteur de ribosylation de l'ADP localisé dans le Golgi
HBSS	« Hank's balanced Salt Solution »
HeLa	« Henrietta Lacks »
HOPS	« Homotypic fusion and vacuole protein sorting »
HSP	« Hereditary spastic paraplegia », paraplégie spastique héréditaire
ILV	« Intraluminal vesicles », vésicules intraluminales
ISR	Intensité spécifique relative
KO	« Knock-out »
	« Lysosome-associated membrane protein »,



LAMP	protéine associée à la membrane lysosomale
LC3	« Microtubule-associated protein light chain 3 », chaîne légère 3 de la protéine associée aux microtubules
LIMP2	« Latent infection membrane protein 2 »
LYST	« Lysosomal trafficking regulator », régulateur du trafic lysosomal
M6P	Mannose-6-phosphate
MAP	« Microtubule-associated protein », protéine associée aux microtubules
MEC	Matrice extracellulaire
MP	Membrane plasmique
MTORC1	« Mechanistic target of Rapamycin complex 1 »
MVB	« Multivesicular bodies », corps multivésiculaires
NT	Non traité
P62	Protéine 62
PDase	Phosphodiesterase alcaline
Rab-GTPase	« Ras-associated protein-guanosin triphosphatase »
RE	Réticulum endoplasmique
RPM	« Revolutions per minute », tours par minute
RT-qPCR	« Real time quantitative polymerase chain reaction »
SC	Culot de la fraction S
SNARE	« Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor »
SNc	Système nerveux central
SNp	Système nerveux périphérique
SPG	« Spastic paraplegia-associated gene », gène associé à une paraplégie spastique
SS	Surnageant de la fraction S
TFEB	« Transcription factor for E-box »
TGN	« Trans-Golgi network », réseau trans-Golgien
HCL	Chlorure d'hydrogène
vATPase	« Voltage-dependent adenosin triphosphatase »
VPS	« Vacuolar proteins-sorting protein », protéine de tri des protéines vacuolaires
WASH	« Wiskott-Aldrich syndrome protein and scar homolog »



## INTRODUCTION

1	Système nerveux central et neurones moteurs .....	1
1.1	Généralités et organisation du système nerveux .....	1
1.2	Composants cellulaires .....	2
1.2.1	Structure.....	2
1.2.2	Circuits du système nerveux.....	3
1.3	Fonction synaptique.....	4
1.3.1	Synapses électriques .....	4
1.3.2	Synapses chimiques.....	4
2	Trafic vésiculaire dans les neurones .....	5
2.1	Généralités.....	5
2.2	Système endolysosomal .....	6
2.2.1	Généralités .....	6
2.2.2	Composition du système endolysosomal .....	7
2.2.3	Transport vers, à partir de, et entre compartiments du système endolysosomal .....	10
2.2.4	Système endolysosomal et système nerveux.....	14
3	Paraplégies spastiques héréditaires .....	16
3.1	Généralités.....	16
3.2	Paraplégies spastiques et système endolysosomal .....	16
3.2.1	Exemples de SPG causées par des mutations de protéines du système endolysosomal .....	17
4	Paraplégie spastique 21 .....	19
4.1	Généralités.....	19
4.2	Maspardine.....	19
4.2.1	Morphologie de la protéine .....	19
4.2.2	Mutations dans le gène qui code pour la maspardine .....	19
4.3	Symptômes.....	19
5	Objectifs.....	21
5.1	Contexte.....	21
5.2	Localisation subcellulaire de la maspardine dans les cellules SK-N-BE.....	21
5.3	Localisation subcellulaire de la maspardine en cas de surcharge lysosomale ou d'autophagie.....	21
5.4	Expressions protéique et génique des marqueurs de l'autophagie en cas d'absence d'expression de la maspardine.....	22

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

1	Cultures cellulaires et transfections .....	23
1.1	SK-N-BE .....	23
1.2	HeLa.....	23
1.3	Conditions de culture.....	23
1.4	Conditions de transfection .....	23
2	Fractionnement subcellulaire.....	23
2.1	Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle (SK-N-BE).....	23
2.2	Adaptation du protocole de fractionnement pour travailler avec une quantité plus faible de cellules (HeLa).....	24



2.3	Fractionnement de cellules SK-N-BE dans un gradient de densité Percoll (après fractionnement différentiel complet) .....	25
2.4	Centrifugation supplémentaire de la fraction S obtenue par fractionnement de cellules SK-N-BE ou de cellules HeLa .....	25
2.5	Conditions des différents fractionnements.....	25
3	Western blots.....	25
4	Dosages enzymatiques.....	26
5	PCR quantitative en temps réel.....	28
6	Analyse statistique des résultats de western blotting et de dosage enzymatique .....	28

## RESULTATS

1.	Etude de la localisation subcellulaire de la maspardine .....	30
1.1.	Etablissement des profils de distribution relatifs des compartiments intracellulaires majeurs des cellules de neuroblastome SK-N-BE après un fractionnement subcellulaire par une méthode de centrifugation différentielle .....	30
1.2.	Analyse de la distribution de la maspardine après fractionnement de cellules SK-N-BE par centrifugation différentielle .....	33
1.3.	Analyse de la distribution de la maspardine et de protéines marqueurs de différents organites intracellulaires après centrifugation des organites intracellulaires des cellules SK-N-BE dans un gradient de densité Percoll auto-formé .....	33
1.4.	Analyse de la présence de la maspardine dans de petites vésicules membranaires .....	35
1.5.	Fractionnement subcellulaire de cellules HeLa .....	36
2.	Etude de la localisation de la maspardine lors d'une surcharge lysosomale ou d'activation de l'autophagie .....	38
2.1.	Distribution intracellulaire des marqueurs subcellulaires et de la maspardine dans des cellules HeLa non traitées et traitées.....	39
2.1.1.	Cellules HeLa non traitées et traitées avec du saccharose pendant 24h .....	39
2.1.2.	Cellules HeLa non traitées et traitées avec du saccharose pendant 48h .....	40
2.1.3.	Cellules HeLa non traitées et soumises à un jeûne de 4h.....	40
2.2.	Analyse de l'expression de marqueurs autophagiques après un traitement au saccharose ou après induction d'un jeûne.....	41
2.3.	Expression de gènes qui appartiennent au réseau CLEAR et du gène codant pour la maspardine lors d'une surcharge lysosomale ou en condition de jeûne.....	42
2.3.1.	Cellules HeLa non traitées et traitées avec du saccharose pendant 24h ou 48h	43
2.3.2.	Cellules HeLa non traitées et soumises à un jeûne pendant 2h ou traitées avec de la torine.....	44
3.	Etude de l'expression génique et protéique de marqueurs lysosomaux et autophagiques dans des clones mutants pour la maspardine obtenus par la méthode CRISPR-Cas9 .....	45
3.1.	Analyse de l'expression protéique de marqueurs du lysosome et de l'autophagie en absence de SPG21 .....	45
3.2.	Analyse de l'expression de l'ARNm de marqueurs du lysosome et de l'autophagie en absence de SPG21 .....	47

## DISCUSSION



# Introduction



Le Pr Michel Jadot et ses collaborateurs ont récemment publié les résultats d'une étude à grande échelle qui visait à localiser toutes les protéines du foie de rat parmi les différents compartiments subcellulaires (Jadot M. *et al.*, 2017). Parmi les nombreuses observations intéressantes réalisées à partir de cette « carte de localisations intracellulaires », il a été remarqué que la strumpelline, la spatassine, la spastizine, AP5, LYST et la maspardine présentent toutes une distribution intracellulaire similaire, qui est à la fois lysosomale et cytosolique. Ceci est aisément visualisable avec l'outil mis en place lors de l'étude protéomique pour interroger la banque de données publiées (<http://prolocate.cabm.rutgers.edu>). Parmi ces six protéines, les cinq premières ont déjà été étudiées et associées à des cas de paraplégies spastiques. Nous détaillerons les informations fonctionnelles disponibles sur ces protéines et leur lien avec la paraplégie spastique un peu plus loin dans cette introduction. La sixième protéine de cette liste, la maspardine, est responsable, lorsque mutée, de la paraplégie spastique 21 ou syndrome de Mast. La fonction de cette protéine demeure cependant inconnue. C'est pourquoi, dans le cadre de ce travail, nous avons choisi de nous focaliser sur cette protéine. La paraplégie spastique 21 implique principalement une atteinte progressive des neurones moteurs causant une faiblesse au niveau des membres inférieurs et supérieurs. Dans cette introduction, je parlerai donc brièvement du système nerveux avant d'introduire ce que sont les paraplégies spastiques et quels sont les rôles connus des protéines endolysosomales qui sont associées à ces pathologies. Je présenterai ensuite ce qui est actuellement connu sur la paraplégie spastique 21 et la maspardine.

## 1 Système nerveux central et neurones moteurs

### 1.1 Généralités et organisation du système nerveux

Le système nerveux peut être défini comme un réseau organisé qui permet une transmission de signaux électriques. Il est composé de différents types cellulaires : les neurones et plusieurs sortes de cellules gliales. Les signaux électriques sont transmis des neurones sensitifs à des inter-neurones et à des neurones moteurs qui donnent une information aux glandes, organes, muscles etc. pour qu'ils effectuent une action (Kandel E. R. *et al.*, 2012).

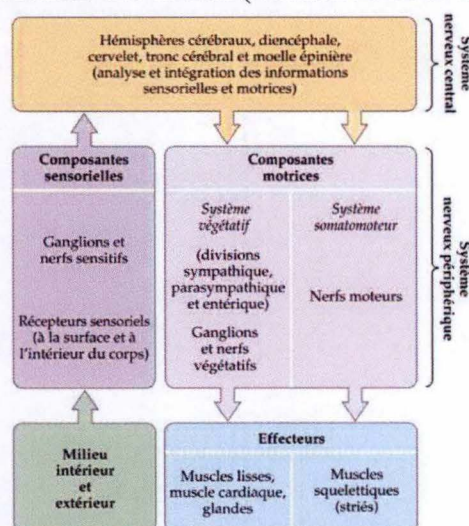


Figure 1 : Structure générale du système nerveux (Purves D. *et al.*, 2015). Les milieux intérieur et extérieur comportent des composantes sensorielles telles que des récepteurs capables de détecter des signaux qui seront alors transmis au système nerveux central. Ce dernier retransmet alors ces informations aux composantes motrices du système nerveux périphérique qui sont elles-mêmes en contact avec des effecteurs. Ces effecteurs produiront alors une réponse adaptée au stimulus interne ou externe à l'origine de l'information.



Le système nerveux est divisé en deux parties fonctionnelles : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNp) (fig. 1).

Le SNC est constitué du cerveau et de la moelle épinière. Dans cet organe et ce tissu interagissent de nombreux neurones et cellules de soutien pour effectuer des fonctions intégratives. Les inter-neurones sont confinés dans le SNC et les neurones sensitifs ainsi que les neurones moteurs font partie du SNp (Kandel E. R. *et al.*, 2012).

## 1.2 Composants cellulaires

Le système nerveux est constitué de plusieurs types cellulaires différents. Ils peuvent être principalement divisés en deux catégories : les cellules nerveuses, ou neurones, et les cellules gliales qui constituent la névroglie (fig. 2). Nous nous concentrerons ici sur les neurones.

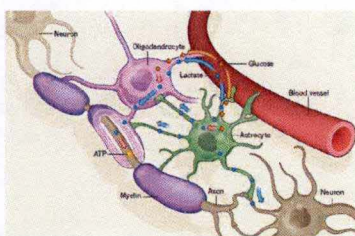


Figure 2 : Différents types cellulaires présent dans le système nerveux (Rinholm J.E. *et al.*, 2012).

### 1.2.1 Structure

Les neurones sont spécialisés dans la communication intercellulaire via des signaux électriques et des neurotransmetteurs dont nous parlerons respectivement dans le point 1.3.1 et 1.3.2. Cette fonction est permise par leur morphologie particulière et leur membrane. Les neurones sont composés d'un corps cellulaire et d'un ou plusieurs axones dont les extrémités forment les boutons terminaux. Des dendrites longilignes émanent du corps cellulaire du neurone et sont le siège de l'afférence synaptique venant d'autres neurones (fig. 3). Ces prolongements contiennent un cytosquelette spécifique permettant le transport des neurotransmetteurs (Purves D. *et al.*, 2015 ; Hines M. L. *et al.*, 2001).

Le cytosquelette des neurones est composé de protéines fibrillaires ou tubulaires, comme les lamines par exemple, retrouvées également dans d'autres types cellulaires. Cependant, celles-ci présentent une organisation particulière qui est indispensable pour le bon fonctionnement des dendrites et jonctions synaptiques. Ce sujet sera approfondi dans le paragraphe de la voie d'endocytose (point 2.2.3.1).

Les différentes protéines du cytosquelette sont nécessaires à la croissance des axones et des dendrites, au positionnement correct des organites et des vésicules ainsi qu'au fonctionnement des processus tels que l'endocytose et l'exocytose, indispensables à la fonction synaptique (Purves D. *et al.*, 2015).

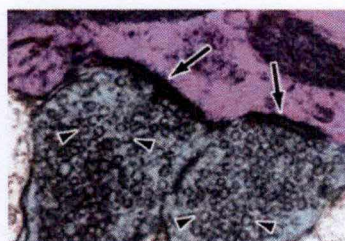


Figure 3 : Boutons terminaux (en bleu) formant une synapse, montrée par les flèches, avec des dendrites (en violet). Les pointes de flèches représentent des vésicules synaptiques chargées de neurotransmetteurs (Purves D. *et al.*, 2015).



## 1.2.2 Circuits du système nerveux

Le système nerveux peut être divisé en un système sensoriel, capable de capter et traiter les informations venant de l'environnement, et un système moteur, qui permet à l'individu de répondre adéquatement aux stimuli perçus. Entre ces deux grands systèmes se situent de multiples circuits (Purves D. *et al.*, 2015) (fig. 4).

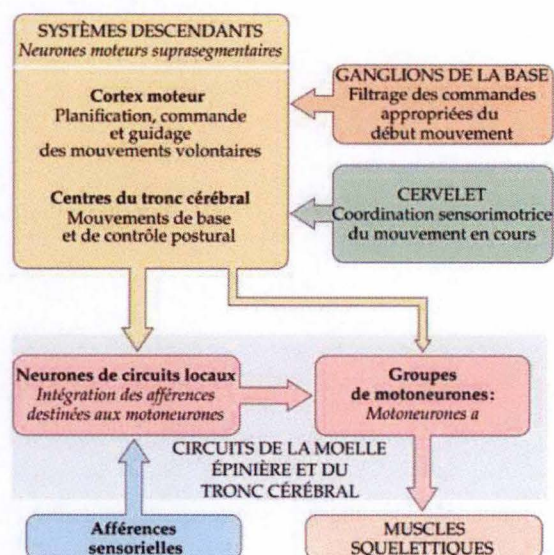


Figure 4 : Structure de la communication entre système sensitif et système moteur (Purves D. *et al.*, 2015). Les informations transmises aux muscles du système moteur peuvent avoir deux origines : les afférences sensorielles du système nerveux sensoriel et les ganglions et cervelet permettant un filtrage, une organisation et une coordination de ces informations.

### 1.2.2.1 Système sensitif

Les neurones sensitifs font partie du SNp et sont situés dans tout le corps. La sensibilité somatique commence par la perception de stimuli par les fibres nerveuses afférentes dont les extrémités périphériques se situent principalement dans la peau et les muscles. Les messages sont renvoyés vers des destinations diverses du SNC. Ces messages peuvent donner des informations différentes telles que la proprioception d'un organe ou la douleur (Purves D. *et al.*, 2015).

Les fibres afférentes sensorielles se différencient au niveau de leur seuil de discrimination mais également au niveau de leur dynamique de réponse. En effet, certains récepteurs vont décharger un signal rapidement dès l'apparition d'un stimulus et devenir ensuite silencieux tandis que d'autres émettent un signal continu (Purves D. *et al.*, 2015).

### 1.2.2.2 Système moteur

La contraction des muscles squelettiques striés démarre à partir d'un signal électrique venant des motoneurones de la moelle épinière ou du tronc cérébral. Les axones des neurones moteurs supérieurs viennent du cortex moteur cérébral et passent ensuite à travers les pyramides médullaires où ils se séparent pour former notamment les voies cortico-spinales latérales dans la moelle épinière. Ces neurones rentrent en contact direct ou indirect avec les neurones moteurs inférieurs de la corne antérieure de la moelle épinière (Blackstone C., 2010). Le corps cellulaire de ces motoneurones se retrouve donc dans la corne ventrale de la



substance grise de la moelle épinière et leur extrémité rejoint les muscles via les racines ventrales et les nerfs périphériques (Purves D. *et al.*, 2015).

### 1.3 Fonction synaptique

La communication entre les neurones se passe au niveau de la synapse qui relie les extrémités terminales axonales des neurones pré-synaptiques aux dendrites des neurones post-synaptiques. Il existe deux types de synapses : les électriques et les chimiques (Purves D. *et al.*, 2015 ; Harris K. P. *et al.*, 2015 ; Choquet D. *et al.*, 2013).

#### 1.3.1 Synapses électriques

Les membranes du neurone pré-synaptique et du neurone post-synaptique forment une structure, appelée jonction communicante, qui comporte des canaux appariés l'un en face de l'autre pour former un pore appelé connexon (fig. 5).

Les substances pouvant passer par les connexons sont de différentes natures, telles que des ions ou des molécules de plus grande taille comme des organites et de l'ATP (Purves D. *et al.*, 2015 ; Harris K. P. *et al.*, 2015).

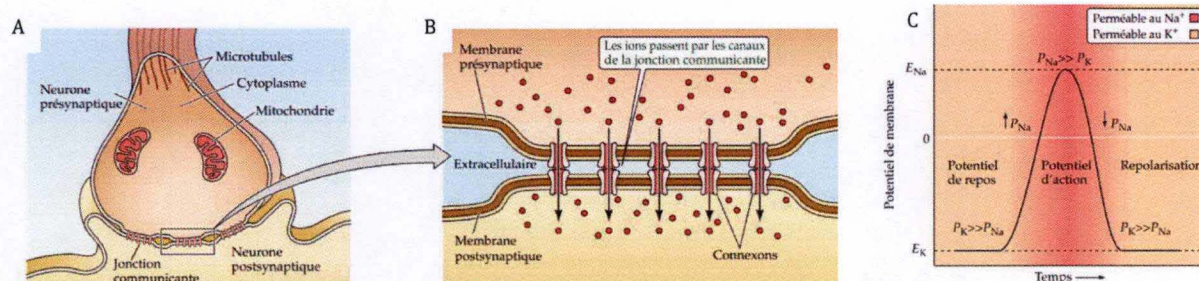


Figure 5 : A) Vision globale d'une synapse électrique. B) Zoom sur une jonction communicante. C) Fonctionnement d'un potentiel d'action (Purves D. *et al.*, 2015).

Le fonctionnement des synapses électriques est basé sur un passage de courants ioniques de neurone à neurone via les pores connexons. Ces courants sont créés par potentiel d'action qui reflète des changements de perméabilité de la membrane des axones à certains ions. Ces changements consistent en une augmentation rapide et transitoire de la perméabilité au sodium, donnant naissance à la phase ascendante du potentiel d'action, suivie d'une augmentation plus lente et durable de la perméabilité au potassium, rétablissant ainsi un potentiel de repos (Purves D. *et al.*, 2015 ; Harris K. P. *et al.*, 2015).

#### 1.3.2 Synapses chimiques

L'espace séparant le neurone pré-synaptique et le neurone post-synaptique au niveau de la jonction axone-dendrite est appelé la fente synaptique. Dans la terminaison pré-synaptique sont retrouvées des vésicules synaptiques limitées par une membrane et transportant des neurotransmetteurs.

Un potentiel d'action provoque l'ouverture de canaux calciques présents dans la membrane de l'extrémité pré-synaptique et la hausse de la concentration en ions  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme de la terminaison provoque la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique du neurone. Les neurotransmetteurs, contenus dans les vésicules, sont libérés dans la fente synaptique ce qui permet leur liaison à des récepteurs spécifiques situés en membrane du neurone post-synaptique. Ceci entraîne l'ouverture ou la fermeture de canaux à ions provoquant dans le neurone post-synaptique un nouveau potentiel d'action (Purves D. *et al.*, 2015 ; Wu H. *et al.*, 2010 ; Choquet D. *et al.*, 2013 ; Emes R. D. *et al.*, 2012) (fig. 6).



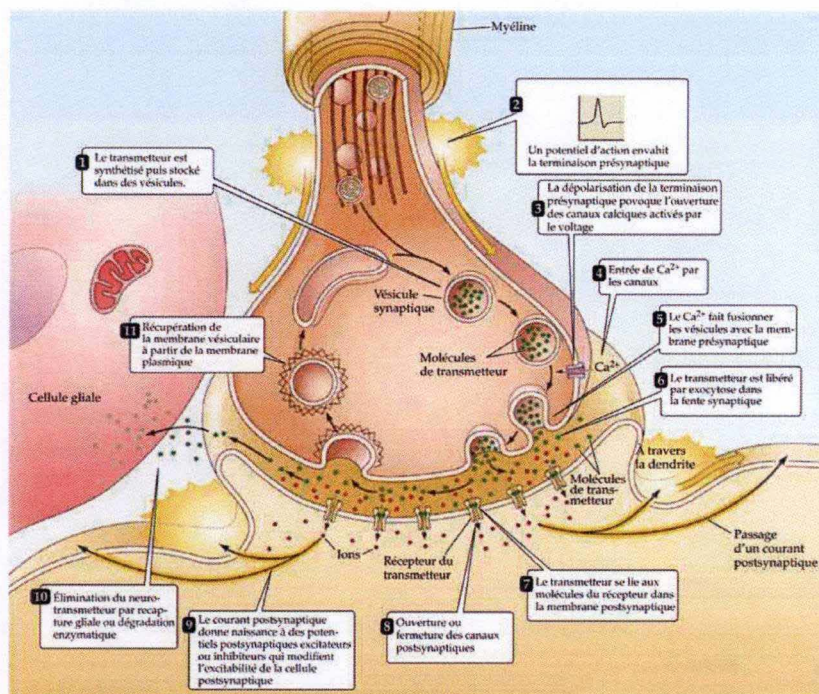


Figure 6 : Fonctionnement d'une synapse chimique (Purves D. *et al.*, 2015).

## 2 Trafic vésiculaire dans les neurones

### 2.1 Généralités

Le trafic vésiculaire le long des axones (fig. 7) est très important, notamment pour amener les vésicules synaptiques vers la membrane du neurone pré-synaptique et permettre leur fusion avec cette dernière (Jeyakumar M. *et al.*, 2005). Il est aussi important pour permettre le recyclage de ces vésicules synaptiques via un processus d'endocytose. En effet, dès qu'une vésicule synaptique a fusionné avec la membrane plasmique pré-synaptique, en parallèle le processus d'endocytose permet la reformation d'une autre vésicule afin de maintenir le quota de vésicules synaptiques présent dans le neurone (Saheki Y. *et al.*, 2012).

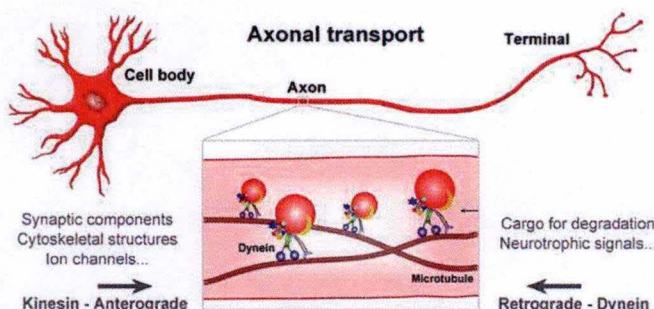


Figure 7 : Processus du transport axonal (Chowdary P.D. *et al.*, 2015). La kinesine et la dyneine sont des protéines de transport qui assurent respectivement le transport axonal antérograde et rétrograde des composants expliqués dans le corps du texte.

La survie des neurones dépend d'un renouvellement continu des composants intracellulaires par autophagie et/ou endocytose (Nixon R. *et al.*, 2000). En effet, il a déjà été démontré que dans de nombreuses neuropathologies, une déficience de ces processus mène à une mort cellulaire accrue à cause d'une accumulation de composants cellulaires anormaux (Puyal J. *et al.*, 2009). Cette survie neuronale dépend également d'un transport régulé de certains organites, comme les mitochondries, entre le corps cellulaire neuronal et les extrémités



axonales. Les neurones avec un long axone, comme les neurones moteurs supérieurs des voies corticospinales qui, comme nous le verrons plus loin, sont les plus affectés dans les paraplégies spastiques, offrent un challenge au transport des mitochondries qui sont pourtant essentielles pour l'apport d'énergie à l'extrémité distale de ceux-ci. Les mitochondries apportent en effet l'ATP nécessaire au bon fonctionnement des synapses mais aussi aux potentiels d'action car l'axone a besoin de pompes sodium-potassium ATP-dépendantes pour rétablir les conditions de polarisation de base après un potentiel d'action afin de permettre l'initiation d'un nouveau. Tout ceci explique pourquoi le transport d'organites est primordial et très régulé (Schwarz T. *et al.*, 2013).

Plusieurs types de transport vésiculaire prennent place dans les neurones. Comme déjà mentionné ci-dessus, un de ces types peut être le transport des mitochondries pour répondre aux besoins énergétiques du neurone mais ce n'est pas le seul qui se base sur un déplacement vésiculaire. En effet, l'endocytose, par exemple, est primordiale pour amener du matériel extracellulaire devant être dégradé vers les lysosomes. D'autre part, le transport biosynthétique est nécessaire pour former des organites et des vésicules synaptiques. Enfin, le processus d'autophagie est indispensable pour la survie cellulaire. Ces trois derniers types de transport seront mieux expliqués dans le chapitre 2.2.3. Nous savons que la maspardine est une protéine partiellement lysosomale or les lysosomes ont plusieurs fonctions très importantes dans les neurones, notamment dans la dégradation des protéines neuronales et le recyclage des neurotransmetteurs (Kononenko N. *et al.*, 2017). Dans l'introduction de ce mémoire, nous avons donc décidé de nous intéresser principalement à cet organite et au système endolysosomal.

## 2.2 Système endolysosomal

### 2.2.1 Généralités

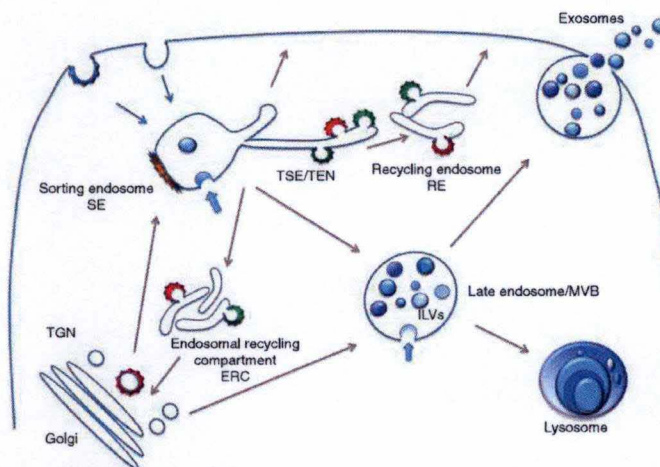


Figure 8 : Différents intermédiaires et processus impliqués dans la voie endocyttaire du système endolysosomal (Klumperman J. *et al.*, 2014)

Certains organites intracellulaires pourvus d'une membrane font partie d'un immense réseau dynamique appelé système endomembranaire (fig. 8). Dans ce système, différentes molécules sont transportées d'un organite à un autre, par exemple du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi ou vers les lysosomes, par l'intermédiaire de vésicules ou d'organites vacuolaires de transport, tels que les endosomes, formés par le bourgeonnement d'un compartiment membranaire. Ce transport est organisé de manière très régulée. En effet, les vésicules et/ou endosomes sont transportés du corps cellulaire vers les extrémités neuronales



via les microtubules et les protéines associées aux microtubules (microtubules associated proteins, ou MAP), notamment la kinésine et la dynéine (fig. 9). La kinésine permet un transport en direction de l'extrémité + du microtubule, ou transport antérograde, et la dynéine un transport vers l'extrémité -, ou transport rétrograde (Kirkpatrick L. *et al.*, 1999). Les MAP, quant à elles, régulent la stabilité des microtubules (Neefjes J. *et al.*, 2014 ; Otomo A. *et al.*, 2012).

L'organisation des microtubules dans les neurones diffère de ce qui peut être observé dans un autre type cellulaire. Les microtubules axonaux ne sont pas continus dans le corps cellulaire et ne sont pas associés à un centre organisateur des microtubules. De plus, ils sont souvent très longs et ont une polarité unique : l'extrémité + est toujours la plus lointaine du corps cellulaire (Kirkpatrick L. *et al.*, 1999). Les microtubules dans les neurones présentent les mêmes constituants que ceux des autres types cellulaires. Cependant, ils montrent des tubulines de nombreux isotypes et modifications post-traductionnelles différents (Kirkpatrick L. *et al.*, 1999). De plus, le transport le long des microtubules peut présenter plusieurs rôles différents comme par exemple biosynthétique pour envoyer les hydrolases nouvellement synthétisées vers les lysosomes ou endocytotique pour assurer une fonction de dégradation.

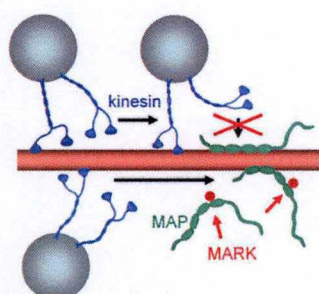


Figure 9 : Communication entre un microtubule (en brun), la kinésine (en bleu) et les MAP (en vert) (Mandelkow E.M. *et al.*, 2004)

La maspardine a été décrite comme étant en partie lysosomale. Nous allons donc nous concentrer sur la partie endolysosomale du système endomembranaire.

## 2.2.2 Composition du système endolysosomal

Les différents compartiments intracellulaires qui composent le système endolysosomal peuvent être distingués selon plusieurs critères : le contenu, la composition moléculaire de leur membrane, la morphologie, le pH interne ou encore la cinétique avec laquelle différentes protéines ou autres macromolécules atteignent ces compartiments (Sachse M. *et al.*, 2002). L'identité des endosomes est également déterminée par le nombre et la nature des Rab-GTPases associées à leur surface. Ces protéines jouent un rôle essentiel pour leur maturation (Neefjes J. *et al.*, 2014).

### 2.2.2.1 Endosomes précoces

Les endosomes précoces sont des petits organites vacuolaires dans lesquels de multiples tubules et vésicules peuvent être observés par microscopie électronique (fig. 10). Des tubules qui émergent à partir de la membrane de ces organites donnent naissance aux endosomes de tri qui servent de station de transit à partir desquels du matériel peut être envoyé vers d'autres compartiments. Des endosomes dits « de recyclage » sont notamment formés à partir des endosomes de tri (Saftig P. *et al.*, 2009 ; Jeyakumar M. *et al.*, 2005). Ils assurent, comme leur nom l'indique, le recyclage de matériel depuis les endosomes vers la membrane plasmique ou vers l'appareil de Golgi. Les endosomes précoces peuvent aussi subir une maturation pour



former des endosomes tardifs capables de délivrer du matériel aux lysosomes (Klumperman J. *et al.*, 2014). Nous décrirons en quelques mots ces divers compartiments dans les paragraphes suivants.

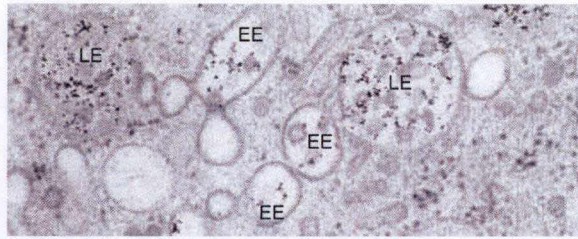


Figure 10 : Image en microscopie électronique d'endosomes précoces (EE) et d'endosomes tardifs (LE) (Klumperman J. *et al.*, 2014)

#### 2.2.2.2 Endosomes de tri

Les endosomes de tri sont le plus souvent recouverts de clathrine (présentée plus en détails dans le chapitre 2.2.3.1) et possèdent des expansions tubulaires dont bourgeonnent les endosomes de recyclage. Les endosomes de tri possèdent plusieurs vésicules intraluminales (intra-luminal vesicles, ou ILVs) ne se trouvant ni en contact avec la membrane de l'endosome, ni dans les tubules (Hurbain I. *et al.*, 2008).

#### 2.2.2.3 Endosomes de recyclage

Les endosomes de recyclage bourgeonnent à partir des tubules émanant des endosomes de tri et se dirigent vers la MP ou l'appareil de Golgi pour recycler leur contenu. Ce rôle sera expliqué plus en détails dans le chapitre 2.2.3.2. (Klumperman J. *et al.*, 2014).

#### 2.2.2.4 Endosomes tardifs et corps multivésiculaires

Les endosomes tardifs sont des petits organites qui sont recouverts partiellement de clathrine (Klumperman J. *et al.*, 2014).

Les endosomes tardifs, ou les corps multivésiculaires (multivesicular bodies, ou MVBs), peuvent être distingués en fonction de leur contenu et de la composition moléculaire de leur membrane. Par exemple, certains MVBs sont pauvres en cholestérol et d'autres en sont riches. Ces derniers fusionnent plus facilement avec la MP, donnant ainsi naissance à des exosomes. Ceci a été démontré grâce à la structure membranaire de ces exosomes qui est similaire à celles des endosomes riches en cholestérol. Ainsi, certains MVBs ont pour fonction de former des exosomes tandis que les autres sont spécialisés dans le transport vers les lysosomes (Möbius W. *et al.*, 2002 ; Budchow S.I. *et al.*, 2009).

#### 2.2.2.5 Lysosomes

Les lysosomes sont des organites sphériques d'un diamètre de 200 nm à 1 µm (fig. 11), denses aux électrons et très riches en hydrolases acides. Sur certaines zones de leur surface, ils possèdent également des protéines transmembranaires aux fonctions diverses expliquées plus loin (Klumperman J. *et al.*, 2014 ; Winchester B. G., 2001).

Les lysosomes présentent un pH d'environ 4,5, ce qui est indispensable pour la fonction des enzymes y résidant (Saftig P. *et al.*, 2009).



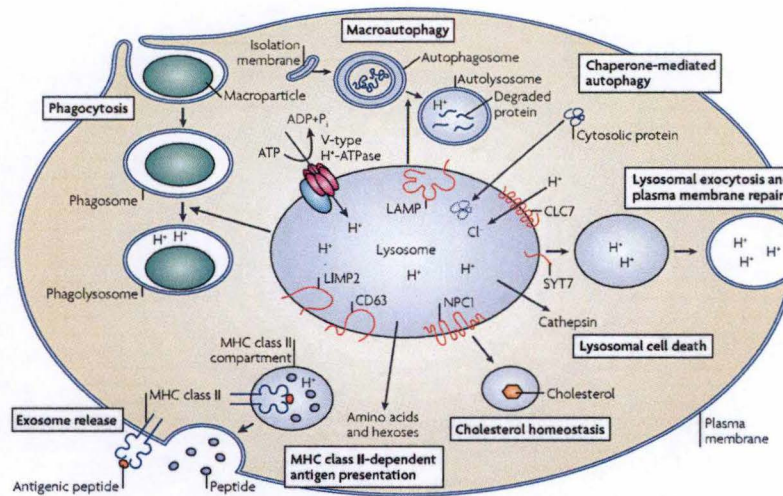


Figure 11 : Différentes fonctions des lysosomes (Saftig P. *et al.*, 2009).

Le rôle principal des lysosomes est la dégradation de macromolécules et le recyclage des produits de dégradation vers le cytosol (Saftig P. *et al.*, 2009). Grâce à cette fonction principale, les lysosomes qui, à partir des endosomes, ont récupéré des débris de la membrane plasmique, des os et des tissus quand ils sont endommagés, sont capables de permettre aux hydrolases lysosomales de dégrader ces débris cellulaires et de promouvoir le recrutement de nouveaux éléments pour la réparation des dégâts (Castro-Gomes T. *et al.*, 2016). Grâce à leur rôle de dégradation de macromolécules, ils sont aussi impliqués dans des processus physiologiques tels que la défense contre les pathogènes et l'apoptose (Saftig P. *et al.*, 2009). De plus, les lysosomes jouent un rôle dans l'homéostasie du cholestérol en permettant un efflux de ce lipide vers la MP quand cette dernière est en carence de cholestérol. Enfin, les lysosomes jouent un rôle important dans l'homéostasie cellulaire d'autres substances, grâce aux propriétés de leurs membranes de fusionner avec la membrane d'autres organites ou vésicules (Fraldi A. *et al.*, 2010 ; Neefjes J. *et al.*, 2014).

Pour permettre toutes ces fonctions, les lysosomes renferment tout un arsenal d'hydrolases acides capables de dégrader une grande variété de macromolécules (Boonen M. *et al.*, 2016 ; Sabatini D. D. *et al.*, 2013 ; de Duve C. *et al.*, 1955).

Les hydrolases acides sont impliquées dans la dégradation lysosomale mais possèdent aussi d'autres fonctions comme l'apprêtement des antigènes (Otomo A. *et al.*, 2012 ; Saftig P. *et al.*, 2009). Elles exercent ces fonctions sur des substrats spécifiques. Elles représentent donc toutes ensemble les capacités cataboliques totales des lysosomes. Elles sont également impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et l'initiation de l'apoptose (Saftig P. *et al.*, 2009).

Les lysosomes présentent également des protéines transmembranaires. En 2015, plus de 50 protéines membranaires différentes ont été dénombrées dans les cellules de mammifères mais les études sont encore en cours (Xu H. *et al.*, 2015). Les protéines membranaires lysosomales exercent diverses fonctions telles que la protection de la membrane grâce à des protéines fortement glycosylées, l'acidification de la lumière des lysosomes grâce aux pompes à protons vATPases (Jentsch T. *et al.*, 2007 ; Steinberg B.E. *et al.*, 2010 ; Mindell J. *et al.*, 2012) et l'export du matériel dégradé dans le lysosome grâce aux transporteurs membranaires (Otomo A. *et al.*, 2012 ; Saftig P. *et al.*, 2009). Les protéines membranaires lysosomales les mieux décrites sont LAMP1, LAMP2, la tétraspanine et LIMP2 (Otomo A. *et al.*, 2012 ; Saftig P. *et al.*, 2009).



## 2.2.3 Transport vers, à partir de, et entre compartiments du système endolysosomal

### 2.2.3.1 Voie d'endocytose

Le système endolysosomal se base sur différents processus : internalisation, recyclage, transport et dégradation de composants cellulaires et extracellulaires (Jeyakumar M. *et al.*, 2005).

L'endocytose commence par la reconnaissance par un récepteur d'endocytose du cargo destiné à être internalisé. Ce récepteur possède sur sa queue cytoplasmique un motif d'internalisation tyrosine de type YXX $\Phi$  ou NPXY capable de lier des protéines adaptatrices (AP). Ces dernières sont alors à l'origine de la formation, à partir de la membrane plasmique (MP), de petites vésicules recouvertes de clathrine qui vont permettre l'internalisation du cargo (Pandey K. N., 2009 ; Kozik P. *et al.*, 2010 ; Parkar N. S. *et al.*, 2009). La clathrine est un assemblage de trois chaînes lourdes associées, chacune, à une chaîne légère. Ceci est disposé telle une structure à trois bras, ou « triskelion », qui est l'unité de base du manteau de clathrine (fig. 12) (Royle S. J., 2012).

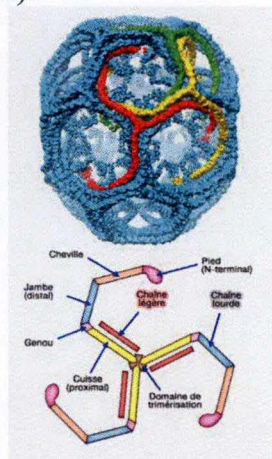


Figure 12 : Manteau de clathrine (en haut) et structure de l'unité de base du manteau de clathrine, ou triskelion (en bas) (Popova N. V. *et al.*, 2013).

Les vésicules de clathrine sont ensuite transportées vers les endosomes précoces, présents à la périphérie cellulaire (Mayor S. *et al.*, 2007).

A partir des endosomes précoces, le matériel endocyté est soit recyclé vers la membrane plasmique via les endosomes de tri ou de recyclage, soit envoyé vers les endosomes tardifs avant de rejoindre le lysosome pour y être dégradé (Neefjes J. *et al.*, 2014).

Les divers types d'endosomes mettent en commun leur contenu par divers moyens comme un transport vésiculaire, des connexions tubulaires ou des événements de *kiss-and-run* (Saftig P. *et al.*, 2009).

Afin de donner naissance aux endosomes tardifs et aux lysosomes, les endosomes précoces subissent des fusions homotypiques, reçoivent de nouveaux composants par transport vésiculaire, mûrent et se condensent par des processus encore mal compris (Rybin V. *et al.*, 1996 ; Saftig P. *et al.*, 2009).

Lors de la maturation endosomale, les endosomes sont petit à petit enrichis en protéines lysosomales telles que les hydrolases acides (Bonifacino J.S. *et al.*, 2008 ; Huotari J. *et al.*, 2011).



La fusion membranaire entre les différents éléments du système endolysosomal requiert aussi les protéines SNARE (fig. 13). Ces protéines sont principalement divisées en deux catégories : les v-SNARE sont présentes en membrane de la vésicule tandis que les t-SNARE sont en membrane du compartiment cible. Les v-SNARE et les t-SNARE entrent en contact et se fixent l'une à l'autre, ce qui permet le rapprochement des membranes jusqu'à leur fusion (Duman J. *et al.*, 2003).

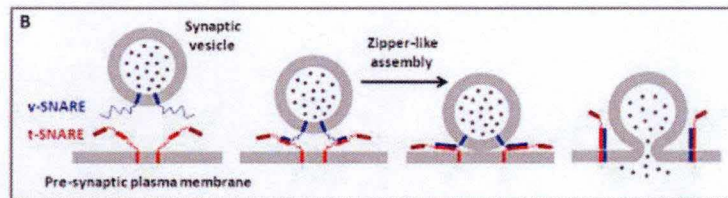


Figure 13 : Fonctionnement de la fusion membranaire entre vésicules à l'aide des protéines SNARE (Taresté D.)

Le complexe homotypique de tri et de fusion des protéines vacuolaires (homotypic fusion and vacuole protein sorting, ou HOPS) contrôle le transport des endosomes tardifs et leur fusion avec les lysosomes (Neeffes J. *et al.*, 2014). Il s'agit d'un complexe protéique très conservé composé de plusieurs protéines de « sorting » vacuolaire (VPS) important pour la fusion entre les endosomes/vacuoles et les lysosomes dans le système endolysosomal (Solinger J. A. *et al.*, 2013).

L'endocytose joue un rôle très important dans la récupération de nutriments (Royle S. J., 2012 ; Kozik P. *et al.*, 2010) ainsi que dans le contrôle de la densité des récepteurs présents en membrane cellulaire (Royle S. J., 2012). L'endocytose présente également des fonctions propres au type cellulaire comme dans la réponse immunitaire ou la fonction synaptique (Kozik P. *et al.*, 2010).

### 2.2.3.2 Voie biosynthétique

Les protéines endosomales et lysosomales sont nouvellement synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Nombreuses d'entre elles sont glycosylées dans le RE et subissent une maturation lors de leur passage au travers de l'appareil de Golgi et/ou lors de leur envoi à partir du réseau trans-Golgien (trans-Golgi network, ou TGN) vers les endosomes et les lysosomes, comprenant notamment une mutation de leurs chaînes oligosaccharidiques et un clivage de leur chaîne peptidique (Karp G. *et al.*, 2010 ; Schröder B. *et al.*, 2010).

L'envoi vers les endosomes à partir du TGN peut soit être direct, soit indirect, c'est-à-dire que les protéines sont d'abord envoyées vers la membrane plasmique avant d'être dirigées vers le système endolysosomal par endocytose.

Les protéines transmembranaires endolysosomales possèdent généralement dans une partie exposée au cytosol un petit motif peptidique consensus qui est reconnu par les protéines adaptatrices de la clathrine au niveau du TGN ou de la membrane plasmique. Les motifs les plus fréquents sont de type « tyrosine », comme expliqué pour l'endocytose, et « di-leucine ». Les séquences consensus des motifs « tyrosine » sont le plus souvent YXXΦ (dans lequel Φ est un acide aminé hydrophobe, souvent à large chaîne latérale), comme ce que nous avons déjà pu voir pour l'endocytose, tandis que les motifs de type « di-leucine » sont des peptides du type D/EXLL et D/EXXXLL/I. La reconnaissance de ces motifs par des protéines adaptatrices cytosoliques recrutées sur la membrane du TGN, telles que AP-1 ou les GGA, ou sur la membrane plasmique, comme AP-2, déclenche la concentration des protéines membranaires néosynthétisées et destinées au système endolysosomal dans des puits



recouverts de clathrine. Les vésicules de transport qui émergent de ces puits amènent ensuite les protéines transmembranaires vers un endosome précoce, à partir d'où elles peuvent rejoindre les endosomes tardifs et les lysosomes (Mattera R. *et al.*, 2010 ; Keller P. *et al.*, 1997).

Les hydrolases lysosomales solubles suivent la voie de transport dite « dépendante du mannose-6-phosphate (M6P) » (Saftig P. *et al.*, 2009). Les hydrolases nouvellement synthétisées arrivant au niveau de l'appareil de Golgi acquièrent des résidus M6P sur leur chaîne oligosaccharidique de type « high-mannose ». Ces résidus sont reconnus par les récepteurs transmembranaires au M6P cations-dépendants (CD-MPR) ou cations-indépendants (CI-MPR) qui possèdent un signal d'adressage de type DXXLL et YXX $\Phi$  dans leur queue cytosolique. L'interaction de ces récepteurs avec des protéines adaptatrices de la clathrine permet l'emballage des hydrolases acides dans des vésicules recouvertes de clathrine et leur transport vers les lysosomes. Notons que les récepteurs au M6P ne rejoignent pas les lysosomes. En effet, ils libèrent leur cargo dans un endosome en raison de leur acidification par la vATPase et sont ensuite recyclés, soit vers la membrane plasmique (CI-MPR), soit vers le TGN (CD-MPR et partiellement CI-MPR) (Kornfeld S., 2010 ; Bonifacino J. S., 2014). Le complexe rétromère (fig. 14) joue un rôle important dans le recyclage vers le TGN (Neefjes J. *et al.*, 2014). Ce complexe rétromère est nécessaire pour conserver un pool de récepteurs d'hydrolases lysosomales dans le TGN. VPS26, VPS35 et VPS29 sont les protéines faisant partie de ce complexe. Il s'agit du trimère qui sélectionne les cargos simultanément au recrutement d'autres éléments du complexe rétromère en surface des endosomes (Seaman M. *et al.*, 2012). Le complexe du rétromère induit la formation de tubules à partir de l'endosome qui deviendront des vésicules de transport après leur fission. Cette fission nécessite l'action d'un autre complexe, *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and Scar Homolog* (WASH), recruté grâce à la liaison de son effecteur FAM21 avec VPS35. WASH semble créer des microdomaines qui contraignent le complexe rétromère à certaines zones restreintes des endosomes où les tubules de recyclage se forment, et semble permettre leur fission grâce à un contrôle des protéines motrices des microtubules et de la polymérisation de l'actine (fig. 14) (Derivery E. *et al.*, 2009 ; Seaman M. *et al.*, 2012 ; Neefjes J. *et al.*, 2014).

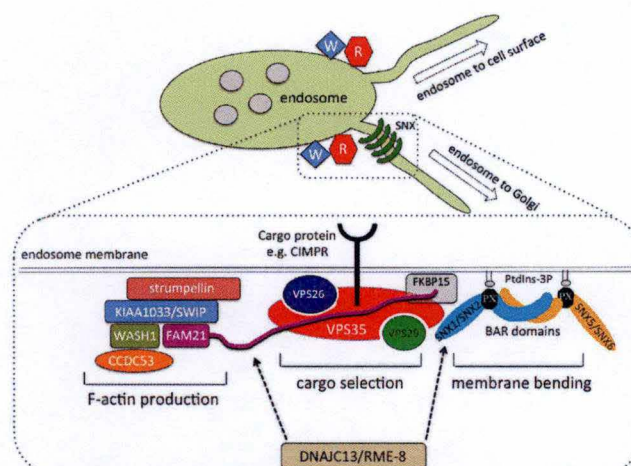


Figure 14 : Interaction entre le complexe rétromère (au milieu) et le complexe WASH (à gauche) en surface des endosomes grâce à la protéine FAM21. Le complexe rétromère est représenté par les trois protéines de « sorting » VPS26, VPS29 et VPS35. Le complexe WASH est composé de plusieurs effecteurs (dont WASH) jouant un rôle dans la polymérisation de l'actine. Pour information, ces deux complexes sont en contact avec des dimères de nexine (à droite) pour permettre la courbure membranaire (Seaman M. *et al.*, 2014).



### 2.2.3.3 Autophagie

Dans cette introduction, nous allons principalement parler de la macro-autophagie (Galluzzi L. *et al.*, 2017).

Dans les cellules, l'autophagie peut être non sélective en cas de signaux de famine et donc permettre la dégradation de macromolécules aléatoirement afin de renouveler le stock d'éléments de base nécessaires à la cellule. Elle peut également être sélective si une molécule ou un organite est détérioré et doit donc être spécifiquement dégradé. L'autophagie exerce donc une action principalement pro-survie cellulaire en protégeant les cellules contre différents facteurs comme la famine ou un stress cellulaire à l'origine de dégâts (Nixon R. *et al.*, 2012).

En plus d'être nécessaire pour la survie cellulaire, la macro-autophagie est également indispensable pour la mort cellulaire programmée qui, en empêchant l'atrophie cellulaire, permet ainsi d'éviter l'accumulation des débris à l'origine de certaines pathologies neurodégénératives, telles que, par exemple, la maladie d'Alzheimer et de Parkinson (Galluzzi L. *et al.*, 2017).

La macro-autophagie peut être divisée en plusieurs étapes : la nucléation, l'élongation, la fermeture de l'autophagosome, la fusion avec le lysosome, la dégradation et le recyclage du lysosome (fig. 15). La nucléation commence par la formation d'une double membrane phospholipidique isolée. Cette membrane va s'allonger afin de séquestrer une partie du cytoplasme, il s'agit de l'étape d'élongation. Cette étape aboutit, lorsque les extrémités de la membrane se rejoignent, à la formation d'une vésicule fermée, appelée autophagosome. Cette dernière fusionne alors avec un lysosome pour donner un autophagolysosome capable de dégrader et donc recycler son contenu en éléments plus simples, il s'agit de l'étape appelée dégradation (Wang C.W. *et al.*, 2003 ; Galluzzi L. *et al.*, 2017). Enfin, l'autophagolysosome est capable de se fissionner afin de reformer un lysosome indépendant.

Ces différentes étapes dépendent de protéines appelées ATG (Galluzzi L. *et al.*, 2017). Les protéines ATG sont variées et possèdent presque toutes un rôle dans l'autophagie tel que dans les étapes de nucléation ou d'élongation mais aussi dans le rapprochement des autophagosomes avec les lysosomes et dans leur fusion (Mizushima N. *et al.*, 2011).

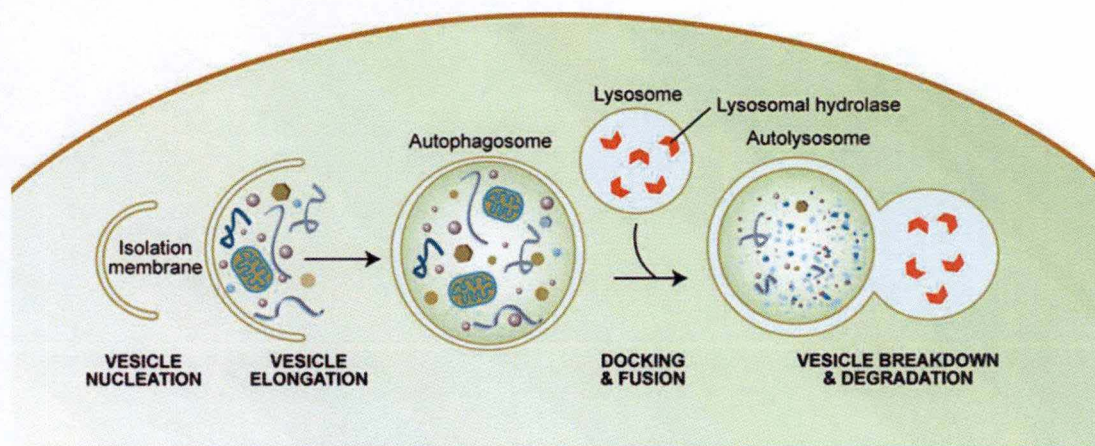


Figure 15 : Processus d'autophagie (Meléndez A. *et al.*, 2009)



## 2.2.4 Système endolysosomal et système nerveux

### 2.2.4.1 Quelques particularités

Le système endolysosomal est indispensable pour le système nerveux.

Dans les neurones, la localisation des éléments du système endolysosomal ainsi que leur déplacement le long des microtubules sont particuliers.

Dans un neurone sain, les endosomes se situent surtout dans le corps cellulaire (Jeyakumar M. *et al.*, 2005) mais dans certaines conditions, comme un état de famine cellulaire par exemple, ils se concentrent dans la périphérie de la cellule (Otomo A. *et al.*, 2012). De plus, dans les neurones, les endosomes tardifs peuvent être transportés dans les deux directions le long des microtubules via une action alternative de la dynéine et de la kinésine. Les endosomes précoces, quant à eux, suivent une direction unique (Neefjes J. *et al.*, 2014).

Il est également décrit dans la littérature que certains sites d'exocytose, comme les synapses des neurones, sont définis par des clusters de cholestérol et donc une accumulation de protéines SNARE permettant le rapprochement et la fusion entre les différents éléments du système endolysosomal (Fraldi A. *et al.*, 2010).

Le système endolysosomal consiste principalement en l'endocytose et l'autophagie.

L'endocytose neuronale, ou processus d'internalisation, se déroule surtout dans les cônes en maturation et les sites pré-synaptiques. Les endosomes sont constamment recyclés au niveau de l'axone, des dendrites et des synapses (Neefjes J. *et al.*, 2014).

L'autophagie est, quant à elle, un processus indispensable et continu dans les neurones (Nixon R. *et al.*, 2012). Dans la littérature, il a déjà été prouvé que les neurones dépendent du processus d'autophagie pour survivre. En effet, ce processus permet d'éliminer les protéines oxydées, défectueuses, agrégées, voire toxiques, et de recycler les unités de base de l'anabolisme (Nixon R. *et al.*, 2000). Si le processus d'autophagie est déficient, des pathologies diverses peuvent apparaître (Nixon R. *et al.*, 2012).

Enfin, le système endolysosomal permet le transport de facteurs neurotrophiques importants pour les signalisations sensitive et motrice neuronales (Neefjes J. *et al.*, 2014), mais aussi de nouveaux lipides et protéines membranaires essentiels à la fonction synaptique (Chevalier-Larsen E. *et al.*, 2006 ; Morfini G.A. *et al.*, 2009). De plus, les événements de remodelage permis par le système endolysosomal sont indispensables pour des fonctions comme la plasticité ou l'homéostasie neuronale ou encore un transport axonal efficace, notamment des composants membranaires vers les extrémités distales du neurone (Blackstone C. *et al.*, 2010).

### 2.2.4.2 Système endolysosomal et pathologies du système nerveux

De par ses fonctions importantes dans le développement et le maintien cellulaire, le lysosome, et donc le système endolysosomal, peut être impliqué dans des neuropathies qui apparaissent pendant l'enfance ou pendant l'âge l'adulte (Bahr B. *et al.*, 2002).

Parmi ces neuropathies se trouvent certaines maladies de surcharge lysosomale (fig. 16) causées par une perturbation de la capacité de dégradation du lysosome, ou du recyclage de produits de dégradation depuis la lumière du lysosome vers le cytosol. Ces déficiences peuvent survenir suite à une accumulation et, souvent, une agrégation de protéines non dégradées ou de produits non exportés du lysosome (Bahr B. *et al.*, 2002) et sont donc souvent accompagnées d'une perturbation du trafic endolysosomal et du processus



d'autophagie (Fraldi A. *et al.*, 2010). Si une hydrolase acide est déficiente, par exemple, son substrat s'accumule dans le lysosome et cette accumulation perturbe la fonction d'autres hydrolases acides dont les substrats s'accumulent à leur tour. Une perturbation de la fusion des lysosomes avec les compartiments qui apportent les protéines à dégrader, tels que les endosomes ou autophagosomes, est une des causes qui peuvent amener à l'accumulation de nombreuses protéines. Les protéines qui s'accumulent et s'agrègent peuvent perdre leur action physiologique (Jeyakumar M. *et al.*, 2005), perturber la fonction physiologique d'autres constituants cellulaires, perturber la perméabilité de la membrane des endosomes et lysosomes et, en conséquence, induire des dommages cellulaires variés (Greiner O. *et al.*, 2017).

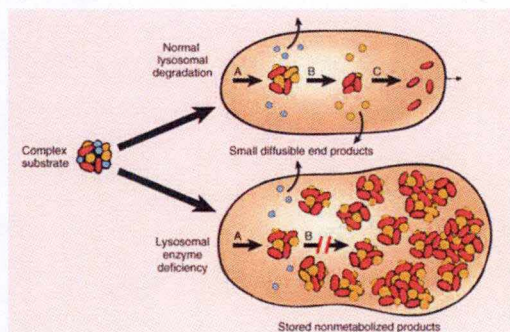


Figure 16 : Principe de surcharge lysosomale (Bychkov A., 2017)

Un exemple est la maladie de Niemann-Pick de type C caractérisée par un défaut dans le transport du cholestérol non estérifié, ce qui provoque son accumulation dans les endosomes tardifs et les lysosomes principalement des cellules du foie, de la rate et, de façon plus délétère, du cerveau (Greiner O. *et al.*, 2017). En effet, cette pathologie est due à une déficience des protéines NPC1/2 qui joueraient un rôle dans l'efflux de cholestérol à partir des endosomes tardifs et des lysosomes, conduisant à terme à une inhibition du processus de dégradation, notamment des protéines endocytées, ainsi que du processus d'autophagie et donc à une dégénérescence neuronale (Fraldi A. *et al.*, 2010 ; Bi X. *et al.*, 2010). Cette dernière peut conduire à des dysfonctions neuronales sévères telles qu'une ataxie, des troubles spastiques et de la démence (Greiner O. *et al.*, 2017).

Un autre exemple est la sclérose latérale amyotrophique qui est due à une accumulation de glucosylcéramide dans les lysosomes des neurones des voies corticospinales. Ceci est associé à une fluctuation d'activité des enzymes lysosomales de ces voies. Il semblerait qu'à terme cette fluctuation est à l'origine d'une perte de l'intégrité de la fonction motrice des membres supérieurs (Dodge J. C., 2017).

Toutes ces observations prises en considération, il semblerait que le trafic de matériel venant du système endolysosomal, ou s'y dirigeant, est crucial pour la santé des neurones vu que, quand il est déficient, de graves pertes de la fonction motrice peuvent être observées. Ceci semble être dû au fait qu'une déficience du transport vésiculaire est spécialement délétère pour les neurones avec de très longs axones, comme c'est le cas pour ceux des voies corticospinales (Morfini G.A. *et al.*, 2009). En effet, comme déjà expliqué dans le point précédent, le transport vésiculaire le long de ces axones assure des rôles très importants. Une déficience du transport endosomal peut aussi conduire au dysfonctionnement de certains organites, comme les mitochondries. Ces dernières étant indispensables au bon fonctionnement des pompes à ions à l'origine du rétablissement du voltage neuronal après potentiel d'action pour permettre l'initiation d'un nouveau, leur dysfonctionnement conduit à terme à des troubles moteurs (Chevalier-Larsen E. *et al.*, 2006).



Un type d'axonopathies va particulièrement nous intéresser dans le cadre de ce mémoire. Il s'agit des paraplégies spastiques héréditaires.

### 3 Paraplégies spastiques héréditaires

#### 3.1 Généralités

Les paraplégies spastiques héréditaires (hereditary spastic paraplegia, ou HSP) représentent un large groupe génétiquement hétérogène de pathologies provoquées par la dégénération axonale des neurones corticospinaux (Noreau A. *et al.*, 2014 ; Fink J. *et al.*, 2014 ; Hensiek A. *et al.*, 2015). La prévalence des HSP est estimée à 1 sur 20 000 individus dans la population générale européenne. Jusqu'ici, près de 70 gènes différents ont été associés avec ces pathologies qui montrent différents âges d'apparition, sévérités et modes de transmission tels que lié à l'X, récessif autosomique ou dominant autosomique (Noreau A. *et al.*, 2014). En fonction des manifestations pathologiques, les différentes HSP sont qualifiées soit de forme pure, soit de forme compliquée (Fink J. *et al.*, 2014 ; Hensiek A. *et al.*, 2015 ; Lo Giudice T. *et al.*, 2014).

Les patients atteints d'une forme pure montrent principalement une faiblesse et une spasticité symétrique progressives des membres inférieurs (fig. 17) accompagnées d'hyper-réflexes et d'une réponse plantaire extensible (Fink J. *et al.*, 2014 ; Hensiek A. *et al.*, 2015 ; Lo Giudice T. *et al.*, 2014).

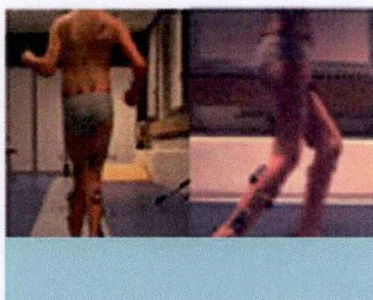


Figure 17 : Analyse de la démarche d'un patient atteint d'une spasticité des membres inférieurs (Armand S. *et al.*, 2015)

L'âge d'apparition des symptômes varie d'un individu à l'autre et les symptômes peuvent apparaître de manière progressive, comme la spasticité, ou non. De plus, les patients ont des difficultés à marcher et à réaliser des tâches de la vie quotidienne. Ils ont donc souvent rapidement besoin d'aides comme des cannes ou des chaises roulantes (Fink J. *et al.*, 2014).

Les patients qui souffrent d'une forme compliquée montrent les mêmes symptômes avec des caractéristiques neurologiques supplémentaires, comme des signes extrapyramidaux, un corps calleux fin, de la surdité ou encore des neuropathies périphériques, et une atteinte des membres supérieurs (Noreau A. *et al.*, 2014 ; Crosby A. *et al.*, 2002 ; Fink J. *et al.*, 2014 ; Lo Giudice T. *et al.*, 2014).

#### 3.2 Paraplégies spastiques et système endolysosomal

Il est intéressant de noter que plusieurs HSP sont causées par des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans le trafic endosomal ou pour une fonction endolysosomale, comme par exemple SPG8, SPG11, SPG15, SPG20, SPG21, SPG33,



SPG48, SPG50/51/52 ou une HSP pas encore classifiée causée par une mutation dans le gène *LYST* (Noreau A. *et al.*, 2014 ; Lo Giudice T. *et al.*, 2014).

### 3.2.1 Exemples de SPG causées par des mutations de protéines du système endolysosomal

SPG11 conduit à l'apparition d'un déficit cognitif, de neuropathies périphériques et d'ataxie. Les patients présentent également un corps calleux plus fin. Les patients souffrant de SPG15 présentent les mêmes symptômes.

SPG11 et SPG15 codent pour la spatascine et la spatizine, deux protéines impliquées dans la reformation de lysosomes à partir d'autophagolysosomes (fig. 18) via un mécanisme de formation de tubules qui bourgeonneraient à partir de ces derniers, se détacheraient sous forme vésiculaire et serviraient de précurseurs à la formation de nouveaux lysosomes (voir chapitre 2.2.3.3). Il est en effet décrit dans la littérature qu'en absence de la spatascine et/ou de la spatizine, une diminution du nombre de lysosomes peut être observée, ce qui ferait penser à un rôle de ces deux protéines dans la reformation de ces derniers. Cependant, ce mécanisme de reformation n'est pas encore bien connu. Il s'ensuit de cette diminution de lysosomes un déficit dans les fonctions lysosomales, notamment de la clearance autophagique des lipides (Chang J. *et al.*, 2014 ; Branchu J. *et al.*, 2017). Lors du processus d'autophagie, les phospholipides provenant de différents organites se retrouvent en surface des autophagolysosomes. L'altération de la reformation de lysosomes à partir de ces derniers lors d'une mutation de la spatascine et/ou la spatizine semblerait alors conduire à une forme de surcharge lipidique dans les lysosomes restants, bien que le mécanisme sous-jacent soit encore énigmatique. SPG11 et SPG15 sembleraient donc jouer un rôle dans la clearance lipidique lysosomale en situation d'autophagie (Rambold A.S. *et al.*, 2015). De plus, la structure secondaire de SPG11 et SPG15 ressemble aux chaînes lourdes de la clathrine et aux sous-unités des protéines de manteau COPI qui participent à l'endocytose (voir chapitre 2.2.3.1) (Chang J. *et al.*, 2014 ; Branchu J. *et al.*, 2017).

Ces observations mènent à penser que la spatascine et la spatizine sont deux protéines impliquées dans le système endolysosomal.

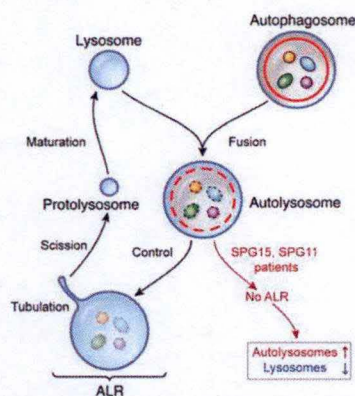


Figure 18 : Processus de reformation des lysosomes à partir d'autolysosomes en situation saine et chez les patients atteints de SPG11 ou SPG15 (Chang J. *et al.*, 2014).

SPG8 code pour la strumpelline, un constituant du complexe central de *Wiskott-Aldrich Syndrome protein* and *Scar Homologue* (WASH). Ce complexe s'assemble à la surface des endosomes afin de recruter le complexe Arp2/3 et induire la polymérisation de l'actine. Comme dit précédemment (voir chapitre 2.2.3.2), cette polymérisation joue un rôle dans la régulation de la fission des tubules formés en surface des endosomes et donc dans le recyclage de certains récepteurs, comme le CI-MPR, à partir de ces endosomes (Jia D. *et al.*, 2010 ; Seaman M. *et al.*, 2014). Bien qu'une dégénérescence des axones des voies cortico-



spinales peut être observée lors d'une mutation de la strumpelline, les mécanismes moléculaires pathologiques sous-jacents ne sont pas encore clairs (Freeman C. *et al.*, 2013).

SPG20 code pour la spartine, une protéine semblant être requise pour l'endocytose clathrine-dépendante du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) en interagissant avec Eps15 (EGFR substrate 15), une protéine accessoire de la voie EGF (Bakowska J.C. *et al.*, 2007). Il a également été décrit qu'en l'absence de spartine, la voie de signalisation dépendante de la protéine osseuse morphogénique (bone morphogenic protéin, ou BMP) est inhibée, ce qui serait à l'origine de la neurodégénération observable chez les patients atteints de SPG20 puisque cette voie est impliquée dans la croissance neuronale et la fonction axonale. En effet, cette voie est extrêmement régulée par divers processus, dont l'endocytose du récepteur de la BMP (Wit) et la spartine semblerait jouer un rôle au niveau de cette endocytose (Hooper C. *et al.*, 2010 ; Nahm M. *et al.*, 2013).

SPG33 code pour la protrudine. Une mutation dans le gène de SPG33 empêche l'interaction de la protrudine avec la spastine, la protéine déficiente dans SPG4. La spastine est un membre de la famille des ATPases qui jouent un rôle dans la dynamique des protéines motrices associées aux microtubules (kinésine et dynéine) et donc dans la tubulation et la fission endosomales (voir chapitre 2.2.3.2). Une mutation dans le gène codant pour la protrudine empêche son interaction avec la spastine et provoque donc un trafic intracellulaire déficient dans les neurones des voies corticospinales (Lo Giudice T. *et al.*, 2014 ; Solowska J. *et al.*, 2015).

Les fonctions de LYST et AP5 (SPG48) sont moins bien décrites mais leur déficience provoque un élargissement des lysosomes et une accumulation de matériel non dégradé, indiquant qu'ils contrôlent la fonction endolysosomale également. LYST semble être impliqué dans la biogenèse des lysosomes et AP5 présente une ressemblance moléculaire avec des adaptateurs de clathrine tels que AP2 ou AP3 (Nagle D.L. *et al.*, 1996 ; Shimazaki H. *et al.*, 2014). De plus, il a été cité récemment que SPG50, SPG51 et SPG52 feraient partie du complexe AP4 qui présente également une ressemblance moléculaire avec AP2 et AP3 (Henziek A. *et al.*, 2015). AP4 serait également capable de reconnaître les motifs YXXΦ (voir chapitre 2.2.3.3) et de permettre le recrutement de ATG9A, à l'origine de l'initiation de l'autophagie (Mattera R. *et al.*, 2017).

Dans une étude récente, il a été montré également que l'absence de AP5 (SPG48) provoquait un changement de localisation de nombreuses protéines. Parmi celles-ci se retrouvent deux des trois sous-unités du complexe rétromère (VPS29 et VPS35), des nexines impliquées dans le recyclage endosome-TGN (voir chapitre 2.2.3.2) mais aussi des éléments du complexe HOPS jouant un rôle dans la fusion endosomes-lysosomes (voir chapitre 2.2.3.1). Il est intéressant à noter que AP5 interagit également avec la spatascine (SPG11) et la spastizine (SPG15) et ce complexe semblerait avoir une action proche de celle du complexe rétromère afin de faciliter le recyclage du CI-MPR (Hirst J. *et al.*, 2018).

Toutes ces observations montrent que les paraplégies spastiques héréditaires ont souvent été associées à des mutations dans des gènes codant pour des protéines avec une fonction dans le système endolysosomal.

Comme nous l'avons mentionné au tout début de cette introduction, lors de l'étude récente réalisée par Jadot M. *et al.* (2017), il a été mis en avant que la strumpelline (SPG8), la spatascine (SPG11), la spastizine (SPG15), AP5 (SPG48), LYST et la maspardine (SPG21) présentent toutes une distribution double à la fois lysosomale et cytosolique.



Il n'y a que très peu d'informations publiées quant à la structure et à la fonction potentielle de la sixième protéine, la maspardine, responsable du syndrome de Mast, ou SPG21.

## 4 Paraplégie spastique 21

### 4.1 Généralités

Une déficience de la maspardine cause la paraplégie spastique 21 (SPG21), qui est également nommée le syndrome de Mast, une forme autosomique récessive compliquée de HSP (Noreau A. *et al.*, 2014 ; Lo Giudice T. *et al.*, 2014 ; Hensiek A. *et al.*, 2015). Cette maladie peu fréquente a été premièrement découverte dans 29 familles de l'Ancien Ordre Amish en 1967 (Simpson M.A. *et al.*, 2003).

### 4.2 Maspardine

#### 4.2.1 Morphologie de la protéine

La maspardine possède un domaine  $\alpha/\beta$ -hydrolase (Zeitlmann L. *et al.*, 2001). Cependant, le domaine de la maspardine n'a pas le triplet catalytique requis pour l'hydrolyse des substrats. Il a été postulé que ce domaine jouerait plutôt un rôle dans les interactions protéine-protéine et dans le trafic des protéines. En effet, grâce à ce domaine, la maspardine interagit avec la queue cytoplasmique de CD4 (une glycoprotéine de la surface cellulaire qui est impliquée dans la réponse immune cellulaire) et cette interaction module l'internalisation et la dégradation par les lysosomes de CD4 (Chertemps T. *et al.*, 2012 ; Simpson M.A. *et al.*, 2003 ; Zeitlmann L. *et al.*, 2001). La maspardine interagit également avec ALDH16A1 (une aldéhyde-déshydrogénase) grâce à ce même domaine. Cependant, la fonction de ALDH16A1 n'est pas connue et il n'a pas été déterminé si cette interaction avec la maspardine est importante pour sa ou ses fonctions (Hanna M. *et al.*, 2009).

#### 4.2.2 Mutations dans le gène qui code pour la maspardine

Deux mutations responsables de la SPG21 ont été décrites dans le gène qui code pour la maspardine, *SPG21*. La première mutation, 601insA, résulte en un décalage du cadre de lecture qui conduit à un codon STOP prématuré (Simpson M.A. *et al.*, 2003). La seconde mutation conduit à une substitution d'un acide aminé en position 108 de la maspardine (A108P). L'échange d'acide aminé se produit dans le domaine de la protéine qui partage des similarités avec les protéines de la famille des  $\alpha/\beta$ -hydrolases et qui serait responsable de certaines interactions de la maspardine avec d'autres protéines (Chertemps T. *et al.*, 2012 ; Simpson M.A. *et al.*, 2003 ; Zeitlmann L. *et al.*, 2001).

### 4.3 Symptômes

Les symptômes sont fort similaires à ceux observés dans d'autres formes compliquées de SPG causées par des mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans le trafic endolysosomal (SPG11 et SPG15 par exemple).

Ces derniers incluent des signes extrapyramidaux, des anomalies pseudobulbaires et cérébelleuses, une hypertonicité, des réflexes brusques et une réponse dorsale plantaire



étendue, ainsi qu'un fin corps calleux (fig. 19), une atrophie frontotemporale et des anomalies de la substance blanche (Chertemps T. *et al.*, 2012 ; Soderblom C. *et al.*, 2010 ; Simpson M.A. *et al.*, 2003).



Figure 19 : Image en résonance magnétique mettant en évidence un corps calleux fin chez un patient atteint du syndrome de Mast (Simpson M.A. *et al.*, 2003).

Les patients atteints du syndrome de Mast présentent souvent des troubles neuro-développementaux, des difficultés motrices et cognitives légères dès le plus jeune âge. Ces troubles conduisent le plus souvent à une démence à l'âge adulte (Simpson M.A. *et al.*, 2003).

Les anomalies de la substance blanche ont déjà été décrites dans la SPG11 et les troubles neuro-développementaux conduisant à une démence ont déjà été observés dans la SPG4 (Simpson M.A. *et al.*, 2003).

Plus récemment, il a été décrit que chez les insectes, une protéine très proche de la structure de la maspardine humaine joue un rôle dans le trafic des molécules odorantes au sein des antennes car elle est détectable principalement dans les cellules à la base de ces dernières (Chertemps T. *et al.*, 2012).

Ces observations relatives aux similarités pathologiques reportées dans la SPG21 et les autres HSP causées par des protéines impliquées dans le trafic endolysosomal, ainsi que la similitude de localisation double lysosomale/cytosolique, nous ont amenés à postuler un rôle de la maspardine dans le trafic intracellulaire, probablement à partir ou vers les lysosomes.



## 5 Objectifs

### 5.1 Contexte

Les paraplégies spastiques héréditaires ont souvent été associées à des mutations dans des gènes codant pour des protéines avec une fonction dans le système endolysosomal.

Lors d'une étude préliminaire récente réalisée par notre équipe sur la protéomique subcellulaire des cellules du foie de rat (Jadot M. *et al.*, 2017), nous avons mis en évidence six protéines qui partagent un profil de distribution similaire. En effet, la strumpelline, la spatascine, la spatizine, AP5, LYST et SPG21 présentent toutes une distribution double à la fois lysosomale et cytosolique. Ces observations suggèrent que ces protéines pourraient être recrutées à partir du cytosol sur les lysosomes. De plus, comme expliqué dans la fin de cette introduction, les cinq premières protéines citées possèdent un rôle dans la fonction lysosomale et/ou le système endolysosomal et sont associées à des paraplégies spastiques, mais il n'y a que peu d'information quant à la structure et la fonction de la sixième protéine, la maspardine. Vu les similarités entre les symptômes montrés par les patients atteints du syndrome de Mast et ceux des patients atteints d'autres paraplégies spastiques et vu la similarité entre la localisation de la maspardine et celle d'autres protéines impliquées dans le système endolysosomal, nous évoquons la possibilité que la maspardine pourrait jouer un rôle dans la fonction ou le système endolysosomal.

### 5.2 Localisation subcellulaire de la maspardine dans les cellules SK-N-BE

La localisation de la maspardine a été décrite récemment dans le foie de rat (Jadot M. *et al.*, 2017). Vu que le syndrome de Mast affecte principalement les neurones moteurs, nous avons choisi un modèle cellulaire de neurones (SK-N-BE) dans le but de se rapprocher le plus possible des conditions d'origine de la pathologie. La première étape de ce mémoire était donc de caractériser la localisation de la maspardine parmi les différents organites et compartiments subcellulaires à l'aide d'un fractionnement complet par centrifugation différentielle et d'un fractionnement Percoll de SK-N-BE, cellules issues d'une lignée de neuroblastome, et de comparer cette localisation à des marqueurs spécifiques de ces différents compartiments.

### 5.3 Localisation subcellulaire de la maspardine en cas de surcharge lysosomale ou d'autophagie

Après avoir étudié la localisation de la maspardine dans des conditions basales au sein d'un modèle proche des cellules impliquées dans le syndrome de Mast, nous avons décidé d'observer cette localisation en cas d'une induction d'une surcharge lysosomale par une exposition à une haute concentration de saccharose et en cas de jeûne. A l'aide de fractionnements sur cellules HeLa, un modèle mieux décrit et plus facile à utiliser pour des tests fonctionnels, nous avons décrit la distribution de la maspardine et des autres marqueurs parmi les compartiments subcellulaires afin d'observer si l'induction d'une surcharge lysosomale ou une période de jeûne influence cette distribution. Un changement de localisation de la maspardine dans cette condition pourrait en effet refléter un rôle de cette protéine dans le trafic endolysosomal comme cela a déjà été observé pour d'autres protéines impliquées dans des paraplégies spastiques. L'expression génique de SPG21 a également été investiguée lors de cette exposition au saccharose ou de ce jeûne et comparée à celle de



certaines éléments du réseau CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation) régulant des fonctions associées aux lysosomes.

#### **5.4 Expressions protéique et génique des marqueurs de l'autophagie en cas d'absence d'expression de la maspardine**

Enfin, nous avons décidé d'utiliser des clones knock-out pour le gène de la maspardine, réalisés par l'équipe en induisant différentes mutations à l'aide d'ARN guides. L'objectif de cette partie du mémoire était d'observer les expressions protéique et génique des marqueurs lysosomaux/d'autophagie et du réseau CLEAR en cas d'absence d'expression de la maspardine.



# Matériel et Methodes



# **1 Cultures cellulaires et transfections**

## **1.1 SK-N-BE**

Les cellules SK-N-BE sont des cellules issues d'un neuroblastome, cancer des cellules nerveuses immatures du système nerveux sympathique, au niveau d'un cerveau humain. Les cellules ont été prélevées à partir d'une métastase située dans la moelle osseuse et sont de genre mâle. Elles ont été obtenues à partir de l'ATCC.

## **1.2 HeLa**

Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire cancéreuse provenant d'un prélèvement de métastase d'un adénocarcinome du col de l'utérus. Les cellules sont de genre femelle et ont été obtenues à partir de l'ATCC.

## **1.3 Conditions de culture**

Tous les types cellulaires ont été mis en culture dans du milieu de Dulbecco Modified Eagle (DMEM) contenant 4,5 g/L de Sucrose avec 10% de sérum fœtal de bœuf (FBS) venant de chez Sigma et 100 U/mL de Penicilline et Streptomycine venant de chez Lonza.

## **1.4 Conditions de transfection**

Les transfections ont été réalisées en utilisant le réactif de transfection d'ADN X-treme Gene 9 venant de chez Roche Diagnostics GmbH, en suivant les indications d'utilisation du fournisseur.

# **2 Fractionnement subcellulaire**

## **2.1 Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle (SK-N-BE)**

Douze boîtes de Pétri contenant une culture de cellules SK-N-BE à un état de 90 à 95% de confluence sont d'abord lavées trois fois avec une solution de sucrose à 0,25M conservée à 4°C dans de la glace. Les cellules sont alors grattées et homogénéisées dans du sucrose 0,25M à l'aide de six passages dans un dounce de 7 mL de contenance (Konter Glass Co.). Le volume final de l'homogénat est de 6,07 mL.

Les homogénats sont centrifugés à 1000g pendant 10' à 4°C dans une centrifugeuse Allegra X-30R. Après décantation partielle, le culot est ajusté à 2 mL avec du sucrose, ré-homogénéisé de la même façon que la première fois et centrifugé à 1000g pendant 7'32'' afin d'obtenir la première fraction, la fraction nucléaire (fraction N).

Les étapes suivantes sont réalisées dans une ultracentrifugeuse L7-35 contenant un rotor 70.1 Ti venant de chez Beckman.

Les deux surnageants obtenus lors des deux dernières centrifugations sont poolés et, après prélèvement d'un aliquot correspondant à la fraction post-nucléaire (fraction E), 4,3 mL sont



centrifugés à 8000 RPM pendant 3'46'' à 4°C. Le culot est alors ajusté à 2 mL avec du sucrose et re-centrifugé dans les mêmes conditions pendant 2'24'' pour obtenir la fraction mitochondriale lourde (fraction M).

Les deux surnageants obtenus lors des deux centrifugations à 8000 RPM sont poolés et 4,3 mL sont centrifugés à 25 000 RPM pendant 4'03'' à 4°C. Le culot est alors ajusté à 1 mL avec du sucrose et re-centrifugé dans les mêmes conditions pendant 2'52'' pour obtenir la fraction mitochondriale légère (fraction L).

Les deux surnageants obtenus lors des deux centrifugations à 25 000 RPM sont poolés et centrifugés à 35 000 RPM pendant 35' à 4°C. Le culot est alors resuspendu dans du sucrose pour obtenir la fraction microsomale (fraction P). Le surnageant correspond à la fraction soluble (fraction S).

Les fractions E, N, M, L, P et S sont conservées pour analyses.

	Centrifugeuse	Rotor	Vitesse de centrifugation	Temps de centrifugation	Fraction du culot	Fraction du surnageant	Statut du surnageant
Centrifugation 1	Allegra X-30R	SX 4250	1000g	10 min	> centrifugation 2	fraction E1	aliquot E + centrifugation 3
Centrifugation 2	Allegra X-30R	SX 4250	1000g	7min32	fraction N	fraction E2	
Centrifugation 3	L7-35	70.1 Ti de Beckman	8000 RPM	3min46	> centrifugation 4	fraction L1	centrifugation 5
Centrifugation 4	L7-35	70.1 Ti de Beckman	8000 RPM	2min24	fraction M	fraction L2	
Centrifugation 5	L7-35	70.1 Ti de Beckman	25000 RPM	4min03	> centrifugation 6	fraction P1	centrifugation 7
Centrifugation 6	L7-35	70.1 Ti de Beckman	25000 RPM	2min52	fraction L	fraction P2	
Centrifugation 7	L7-35	70.1 Ti de Beckman	35000 RPM	35min	fraction P	fraction S	/

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des étapes du fractionnement complet sur SK-N-BE.

## 2.2 Adaptation du protocole de fractionnement pour travailler avec une quantité plus faible de cellules (HeLa)

Toutes les étapes de ce fractionnement sont effectuées dans l'ultracentrifugeuse Optima TLX contenant un rotor TLA 100.3. Lorsqu'il y avait plus de six échantillons de maximum 650 µL à centrifuger simultanément, le rotor utilisé était le TLA 120.1. Quatre boîtes de Pétri contenant un culture de cellules HeLa à un état de 90 à 95% de confluence ont été utilisées pour chaque set et chaque condition.

Les boîtes de Pétri sont d'abord lavées trois fois avec une solution de sucrose à 0,25M conservée à 4°C dans de la glace. Les cellules sont alors grattées et homogénéisées dans du sucrose 0,25M à l'aide de six passages dans un mini-dounce de 2 mL de contenance (Kontor Glass Co.). Le volume final de l'homogénat est de 2 mL.

Les homogénats sont centrifugés à 5000 RPM pendant approximativement 2'42'' à 4°C. Après décantation partielle, le culot est ajusté avec du sucrose, ré-homogénéisé de la même façon que la première fois et centrifugé à 5000 RPM pendant approximativement 2'04'' afin d'obtenir la première fraction, la fraction nucléaire (fraction N).

Les deux surnageants obtenus lors des deux dernières centrifugations sont poolés et centrifugés à 46 000 RPM pendant 35' à 4°C pour culoter la fraction MLP qui est ensuite resuspendue dans du sucrose. Le surnageant correspond à la fraction soluble (fraction S).



2.3 Fractionnement de cellules SK-N-BE dans un gradient de densité Percoll (après fractionnement différentiel complet)

Une fraction MLP est obtenue en poolant les fractions M, L et P ensemble. 500 µL de cette fraction MLP sont chargés par dessus 4,5 mL d’une solution Percoll (18% de Percoll venant de chez Pharmacia, du sucrose 0,25M, de l’EDTA à 2mM et du Tris-HCl à 10mM pH=7,4) et re-centrifugés à 25 000 RPM pendant 45’ à 4°C dans l’ultracentrifugeuse Optimal LE-80K contenant un rotor Sw55Ti venant de chez Beckman Coulter.

Sept fractions sont collectées du haut vers le bas du tube. Afin d’extraire les protéines, et d’enlever les billes de Percoll, pour les analyses par western blot, 300 µL de chacune des sept fractions est mélangée avec du triton X-100 1%, incubée pendant 20’ sur glace et re-centrifugée à 70 000 RPM pendant 20’ à 4°C dans l’ultracentrifugeuse Optima TLX contenant un rotor 120.1 venant de chez Beckman.

2.4 Centrifugation supplémentaire de la fraction S obtenue par fractionnement de cellules SK-N-BE ou de cellules HeLa

Pour certaines expériences, la fraction S (volume=700 µL) est centrifugée à nouveau à 80 000 RPM pendant 30’ à 4°C dans l’ultracentrifugeuse Optima TLX contenant un rotor TLA 120.1 venant de chez Beckman afin de culoter les petites vésicules et les larges agrégats protéiques (fraction SC). Le surnageant est référé en tant que fraction SS et le culot en tant que SC.

2.5 Conditions des différents fractionnements

Les fractionnements ont été réalisés sur deux types cellulaires différents ayant été soumis au préalable à différents traitements (tableau ci-dessous).

type cellulaire	Fractionnements				
	SK-N-BE	HeLa	HeLa	HeLa	HeLa
conditions de l'expérience	non traitées	non traitées	non traitées	non traitées	non traitées
			Sucrose 100 mM 24h	Sucrose 100 mM 48h	jeûne HBSS (Sigma) 4h

Tableau 2 : Organisation des expériences de fractionnements avec ou sans traitement.

3 Western blots

Les différentes fractions obtenues par les fractionnements subcellulaires des cellules SK-N-BE ou des cellules HeLa sont diluées dans le tampon de Laemmi (4% SDS, 20% glycérol, 10% β-mercaptoéthanol, 0.004% bromphenol blue et 0,125M Tris-HCl ; pH=7,8). Pour chaque western blot, une même quantité de protéines a été chargée pour chaque fraction.

Premièrement, les échantillons sont chargés sur des gels d’acrylamide 10% et migrent pendant 1h à 1h30 sous un courant de 160 mV dans un tampon de migration (250 µM de Tris base, 1,92 M de glycine, 1% de SDS et de l’eau ; pH=8,3). Un marqueur de poids moléculaire (Chameleon 800 Pre-stained protein ladder de chez Li-Cor) est chargé également sur le gel. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon-Fl (Merck Millipore), préhydratée au préalable dans du méthanol pendant 1’, durant environ 50’ à 300mA dans du tampon de transfert (20% méthanol, 2,4 g/L de Tris base, 11,5 g/L de glycine et de l’eau).



Après le transfert, les membranes sont bloquées dans du tampon de blocage Odyssey (PBS) venant de chez Li-Cor pendant 1h à température ambiante. Les membranes sont alors incubées toute la nuit à 4°C dans les anticorps primaires. Les anticorps primaires ont été dilués dans du tampon de blocage Odyssey. L'anticorps de souris anti-Masparidine murine ou humaine a été obtenu auprès de Santa-Cruz biotechnology et a été utilisé à une dilution de 1/500. L'anticorps de chèvre anti-Cathepsine D murine ou humaine a également été obtenu auprès de Santa-Cruz biotechnology et a été utilisé à une dilution de 1/250. Enfin, l'anticorps de lapin anti-VPS26 murine ou humaine a été obtenue auprès de Abcam et a été utilisé à une dilution de 1/1000.

Le lendemain, les membranes ont été lavées plusieurs fois dans du PBS contenant 0,1% de Tween et ont été incubées dans les anticorps secondaires anti-souris, anti-chèvre et anti-lapin pendant 1h à température ambiante. Les anticorps secondaires sont adaptés à un système de lecture et d'analyse de western blots en InfraRouge. Ils ont été obtenus auprès de Li-Cor et ont été utilisés à une dilution de 1/10000.

Après plusieurs lavages dans du PBS-Tween 0,1%, puis dans du PBS seul, la membrane est séchée 1h à 37°C. Les signaux ont été révélés grâce au scanner de membranes Odyssey venant de chez Li-Cor, en suivant les instructions du constructeur.

## 4 Dosages enzymatiques

	Substrat	Concentration finale du substrat	Solution de dilution	Température et temps d'incubation	Solution d'arrêt de la réaction	Appareil de lecture	Longueur d'onde de lecture
β-gal	4-MU-β-D-galactopyranoside	5 mM	Tampon citrate (50 mM)/0,05% Triton-X-100	37°C 2h30	Glycine-NaOH (0,1M)	Fluorimètre VersaFluor	Exc 365 nm/ Em 450 nm
α-gluc	4-MU-α-D-glucopyranoside	1 mM	Glycine-NaOH (0,5M)/0,04% Triton-X-100	37°C 2h50	Glycine-NaOH (0,1M)	Fluorimètre VersaFluor	Exc 365 nm/ Em 450 nm
DPPIII	H-Arg-Arg-7-Amido-4-MC hydrochloride	0,3 mM	Tris-HCl (0,5M)	37°C 2h	Tampon Glycine (50 mM)/0,05% Triton-X-100	Fluorimètre VersaFluor	Exc 365 nm/ Em 450 nm
Catalase	H2O2	/	BSA (1 mM)/Tampon Imidazole (10 mM)/0,04% Triton-X-100	37°C 4h30	TiOSO4	Spectrophotomètre UV/VIS Lambda 10	Absorbance à 420 nm
PDase	Tymidine 5'-monophosphate p-nitrophényl ester de sel de sodium	1,5 mM	Glycine-NaOH (0,5M)/0,2% acétate de Zinc (0,01 N)/1,3% NaOH (0,1M)	37°C 15'	NaOH (0,1M)	Spectrophotomètre UV/VIS Lambda 10	Absorbance à 400 nm
Cytox	Cytochrome C de coeur de cheval	4 mM	Tampon phosphate (0,5M)/0,9% EDTA (0,1M)	37°C 1'	/	Spectrophotomètre UV/VIS Lambda 10	Absorbance à 550 nm

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents dosages enzymatiques

Les dosages enzymatiques de la β-galactosidase (β-gal), de l'α-glucosidase (α-gluc) et de la Dipeptidyl peptidase III (DPPIII) sont réalisés en utilisant des substrats spécifiques couplés à des molécules fluorescentes : le 4-méthylumbiliférone (MU) ou le 4-méthylcoumarin (MC), tous deux venant de chez Sigma. Pour ces trois dosages enzymatiques, les substrats



deviennent fluorescents après le clivage des molécules fluorescentes. Cette fluorescence a été lue à 450 nm avec le fluorimètre VersaFluor venant de chez Bio-Rad.

Pour les dosages enzymatiques de la Catalase et de la PDase, l'absorbance des fractions a été lue à 420 nm et 400 nm, respectivement, avec un spectrophotomètre UV/VIS Lambda 10 venant de chez Perkin Elmer.

Pour le dosage enzymatique de la  $\beta$ -gal (marqueur des lysosomes), les fractions ont été incubées à 37°C pendant 2h30 avec 5mM de substrat dilué dans 50 mM de tampon citrate à pH 4,5 contenant 0,05% de Triton-X-100 (90  $\mu$ L de mixture contenant le substrat pour 10  $\mu$ L d'échantillon). La réaction a été stoppée grâce à l'ajout de 0,1M de glycine-NaOH à pH 10,4.

Pour le dosage enzymatique de l' $\alpha$ -gluc (marqueur du réticulum endoplasmique), les fractions ont été incubées à 37°C pendant 2h50 avec 1mM de substrat dilué dans un tampon 0,5M de glycine-NaOH à pH 9 contenant 0,04% de Triton-X-100 (90  $\mu$ L de mixture contenant le substrat pour 10  $\mu$ L d'échantillon). La réaction a été stoppée grâce à l'ajout de 0,1M de glycine-NaOH à pH 10,4.

Pour le dosage enzymatique de la DPPIII (marqueur du cytosol), les fractions ont été incubées à 37°C pendant 2h avec 0,3M de substrat dilué dans 0,5M de Tris-HCl à pH 8 (90  $\mu$ L de mixture contenant le substrat pour 10  $\mu$ L d'échantillon). La réaction a été stoppée grâce à l'ajout de tampon 50mM de glycine à pH 10,5 contenant 0,05% de Triton-X-100.

Pour le dosage enzymatique de la Catalase (marqueur des peroxysomes), les fractions ont été incubées à 37°C pendant 4h30 avec 1 mM de BSA dilué dans 10mM de tampon Imidazole contenant 0,04% de Triton-X-100 et 1 mL d' $H_2O_2$  (500  $\mu$ L de mixture contenant le substrat pour 10  $\mu$ L d'échantillon). La réaction a été stoppée grâce à l'ajout de  $TiOSO_4$ . Puisque c'est la consommation de  $H_2O_2$  qui est mesurée, l'absorbance est lue sous forme de logarithmes.

Pour le dosage enzymatique de la Phosphodiesterase alcaline (PDase) (marqueur de la membrane plasmique), les fractions ont été incubées à 37°C pendant 15' dans 1,5mM de substrat dilué dans 0,5M de tampon glycine-NaOH à pH 9,6 contenant 0,2% d'acétate de Zinc 0,01 N et 1,3% de NaOH 1M (115  $\mu$ L de mixture contenant le substrat pour 10  $\mu$ L d'échantillon). La PDase dégrade le substrat (Tymidine 5'-monophosphate p-nitrophényl ester de sel de sodium) dont la diminution d'absorbance est lue après que la réaction ait été stoppée grâce à l'ajout de 0,1M de NaOH.

Pour le dosage enzymatique de la Cytochrome C oxydase (marqueur des mitochondries), les fractions ont été mixées directement avec 4mM de substrat (cytochrome C) dilué dans 0,5M de tampon phosphate à pH 7,4 contenant 0,9% d'EDTA 0,1M et dans une solution de dilution (0,1M de tampon phosphate contenant 1,25% de Triton-X-100 et 31% d'EDTA 0,1M). Le substrat est dégradé par la cytochrome C oxydase et son absorbance à 550 nm va donc diminuer. Cette diminution d'absorbance a été lue après 1' via le logiciel Lambda 10 Cytowin relié au spectrophotomètre UV/VIS Lambda 10 venant de chez Perkin Elmer, en suivant les indications du logiciel.



## 5 PCR quantitative en temps réel

Pour réaliser la RT-qPCR, les ARNm des cellules HeLa soumises à des traitements ont été extraits et rétrotranscrits en ADNc. Ces deux premières étapes ont été réalisées par un technicien du laboratoire en utilisant le kit d'extraction de QIAGEN (RNAeasy) et le kit de rétrotranscription de Life technologies (RevertAid RT Reverse Transcription Kit), selon les protocoles de la firme.

L'étape suivante étant de mesurer l'abondance relative d'un ARNm pour un gène sélectionné (*TFEB*, *LAMP1*, *LAMP2*, *CTSD* (cathepsine D) ou *SPG21*, et *GAPDH* comme gène rapporteur), nous avons réalisé une PCR quantitative.

Un mix de 15 µL contenant un agent intercalant fluorescent qui se lie à l'ADN double brin (TAKYON, Eurogentec) et les amorces « forward » et « reverse » qui permettent d'amplifier un court fragment d'ADNc a été réalisé (voir amorces dans le tableau ci-dessous).

	Amorce forward	Amorce reverse
<i>TFEB</i>	CCAGAAGCGAGAGCTCACAGAT	TGTGATTGTCTTTCTTCTGCCG
<i>LAMP1</i>	ATGTGTTAGTGGCACCCAGG	TGTTACAGCGTGTCTCTCC
<i>LAMP2</i>	GCAGCTGAACATCACTCAGG	CACAGCAAAGACAAAGTCTAG
<i>CTSD</i>	ATCTCCGTCAACAACGTGCT	TGGGTCCCTGCTCAGGTAGA
<i>SPG21</i>	GGGTCAGAGTGAAGTGGCTT	TCGGGCATTAGGATACAGCT

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées lors des RT-qPCR.

Dans une plaque 96 puits (Eurogentec), le mix est mélangé ensuite à 5 µL de l'ADNc correspondant. La plaque est centrifugée 10' à 1200 RPM (centrifugeuse Allegra) et est introduite dans le machine PCR (light cycler, Roche diagnostics, Belgique). Le programme d'amplification utilisé est le programme standard du logiciel LightCycler 96 (45 cycles de 10'' à 95°C, 10'' à 60°C et 10'' à 72°C, après une incubation de 600'' à 95°C).

Les résultats nous donnent le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre un seuil d'expression prédéterminé (Ct).

Le Ct mesuré pour la *GAPDH* dans chaque échantillon est déduit du Ct mesuré pour le gène cible (Ct gène – Ct *GAPDH*) afin de normaliser ce dernier. La valeur obtenue est appelée  $\Delta$ CT.

Les  $\Delta$ CT calculés pour chaque échantillon sont ensuite comparés. En pratique, le  $\Delta$ CT de l'échantillon contrôle (choisi comme référence) est déduit du  $\Delta$ CT de l'échantillon test, ce qui nous donne le  $\Delta\Delta$ CT. Pour exprimer la différence d'expression du gène entre les deux échantillons en nombre de fois, nous utilisons ensuite la formule suivante :  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Comme contrôles négatifs, l'ARN initial et de l'eau sont utilisés. Cela permet de vérifier qu'il n'y a pas d'amplification à partir d'ADN génomique qui pourrait avoir été co-extrait avec l'ARN, et que nos réactifs (amorces, Takyon) ne sont pas contaminés par de l'ADN.

## 6 Analyse statistique des résultats de western blotting et de dosage enzymatique

Les fractionnements impliquant un traitement des cellules HeLa ont été réalisés deux fois pour chaque type de traitement et, à chaque expérience, les conditions non traitée et traitée ont été réalisées en triplicats.



Des tests statistiques de t-student ont ensuite été réalisés sur les moyennes de deux paramètres mesurés pour la  $\beta$ -galactosidase, la DPPIII, LAMP2 et la maspardine : le pourcentage d'activité/intensité et l'activité/intensité spécifique relative. Le pourcentage de protéines totales a aussi été analysé par un test de t-student.



# Résultats



# 1. Etude de la localisation subcellulaire de la maspardine

## 1.1. Etablissement des profils de distribution relatifs des compartiments intracellulaires majeurs des cellules de neuroblastome SK-N-BE après un fractionnement subcellulaire par une méthode de centrifugation différentielle

La première étape de ce mémoire était d'établir les profils de distribution des compartiments majeurs intracellulaires dans les cellules SK-N-BE après un fractionnement complet par centrifugation différentielle.

Premièrement, les cellules ont été homogénéisées et fractionnées par centrifugation différentielle selon un protocole similaire à celui établi par le Docteur de Duve (de Duve C. *et al.*, 1955).

Lorsqu'une particule est placée dans un champs centrifuge, sa vitesse de progression est proportionnelle à son coefficient de sédimentation. Ce paramètre est lui-même une fonction de la taille, de la densité et de la forme de la particule mais aussi de la densité du solvant. Prenant toutes ces données en compte, le protocole de centrifugation différentielle est basé sur l'utilisation de forces centrifuges croissantes pour sédimenter de manière différentielle les particules (compartiments subcellulaires) caractérisés par des coefficients de sédimentation décroissants. Les fractions obtenues par cette méthode sont : E (le surnageant post-nucléaire), N (la fraction nucléaire), M (la fraction mitochondriale lourde), L (la fraction mitochondriale légère), P (la fraction microsomale) et S (la fraction soluble cytosolique).

Des enzymes « marqueurs » ont été sélectionnées afin de représenter les profils de distribution propres aux différents compartiments subcellulaires auxquels elles sont spécifiquement associées. Des dosages enzymatiques ont ensuite été réalisés pour déterminer le pourcentage d'enzyme présent dans chaque fraction ainsi que le pourcentage de protéines totales. Un facteur d'enrichissement est calculé sur base de ces deux données, en divisant le pourcentage d'activité de l'enzyme cible dans une fraction considérée par le pourcentage de protéines dans cette même fraction. Le rapport obtenu porte le nom d'activité spécifique relative (ASR).

Une représentation graphique reprend cette ASR (en ordonnée) en fonction du pourcentage cumulé des protéines retrouvées dans les différentes fractions (en abscisse). Dans ce graphe, la hauteur de chaque rectangle représente donc l'enrichissement de l'enzyme cible dans la fraction correspondante et la surface de chaque rectangle représente le pourcentage d'activité de l'enzyme dans la fraction. Il est important à noter également que nous avons vérifié que la somme des activités mesurées dans les fractions subcellulaires correspondait bien à l'activité totale mesurée dans l'extrait de départ. Autrement dit, les « pourcentages de récupération » étaient bons pour toutes les enzymes marqueurs (entre 85 et 115%), ce qui signifie que nous n'avons pas perdu de matériel en cours de manipulation.



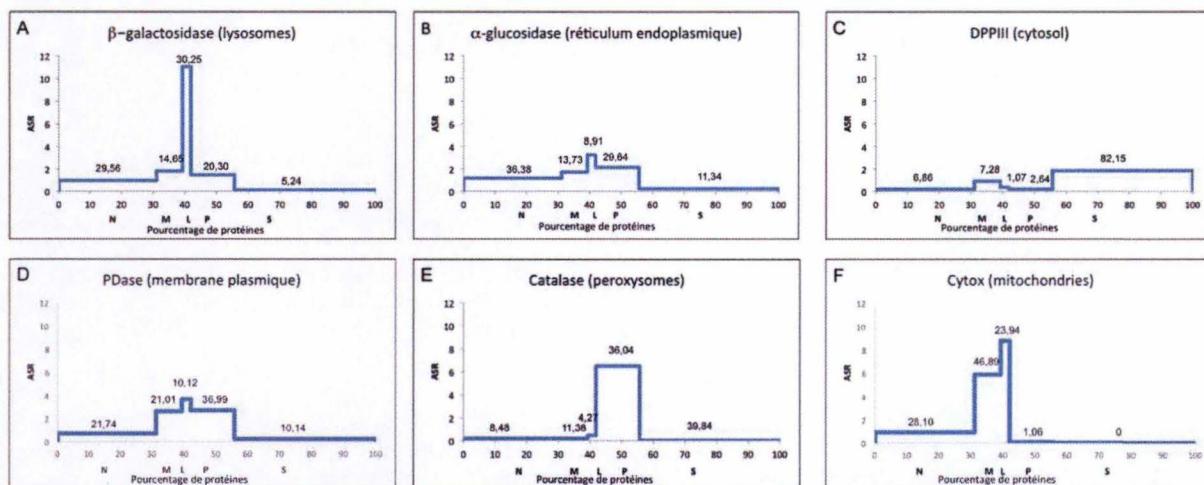


Figure 1 : Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle de cellules de neuroblastomes SK-N-BE. Les graphiques présentent la distribution des organites subcellulaires majeurs. Ces distributions sont représentées par l'activité et le niveau d'enrichissement de protéines marqueurs sélectionnées dans les fractions collectées (N, M, L, P et S). L'activité relative spécifique (ASR, soit le pourcentage d'activité d'une protéine marqueur divisé par le pourcentage de protéines d'une fraction donnée) est comparée au pourcentage de protéines total mesuré dans la fraction. Le pourcentage d'activité de chaque marqueur dans chaque fraction est écrit sur le graphique. A : β-galactosidase/lysosomes. B : α-glucosidase/réticulum endoplasmique. C : Dipeptidyl-aminopeptidase III (DPPIII)/cytosol. D : Phosphodiesterase alcaline (PDase)/membrane plasmique. E : Catalase/peroxisomes. F : Cytochrome C Oxydase (Cytox)/mitochondries. Les chiffres notés au dessus de chaque « rectangle » (si nous traçons une ligne verticale après chaque fraction) sont les pourcentages d'activité mesurés dans une fraction donnée (indiquée par la lettre placée sous l'échelle de l'axe des abscisses).

Nous pouvons voir dans la figure 1 (fig. 1) que l'enzyme marqueur lysosomale, β-galactosidase (β-gal) montre un enrichissement dans la fraction L (ASR d'approximativement 11) et un haut pourcentage d'activité dans les fractions L et M (approximativement 15% et 30% respectivement) (fig. 1A). Ces résultats représentent donc le profil de distribution des lysosomes dans les cellules SK-N-BE. Il est intéressant de mentionner que le pic d'enrichissement dans la fraction L est une caractéristique souvent observée lorsque d'autres organes ou cellules sont fractionnés de cette façon (foie de rat ou cellules HeLa par exemple). La Cytochrome C oxydase (cytox) est une enzyme marqueur des mitochondries, où elle réside dans la membrane interne de l'organite. Son profil de distribution montre un enrichissement dans la fraction L par rapport aux autres fractions (ASR d'approximativement 9) mais surtout un grand pourcentage d'activité dans la fraction M (approximativement 47%) (fig. 1F). La catalase est un marqueur des peroxysomes. Son profil de distribution montre un enrichissement dans la fraction P (ASR d'approximativement 7) et un grand pourcentage d'activité dans la fraction S (approximativement 40%) (fig. 1E). L'α-glucosidase alcaline (α-gluc) et la phosphodiesterase alcaline (PDase) (fig. 1B et 1D) sont respectivement des marqueurs du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique. Leurs profils de distribution diffèrent de ceux de la β-gal et de la cytox principalement par leur présence plus marquée dans la fraction P et leur ASR plus basse dans la fraction L. La dipeptidyl-aminopeptidase III (DPPIII), comme nous pourrions l'attendre d'une enzyme soluble et cytosolique, montre un grand pourcentage d'activité dans la fraction S (approximativement 82%) (fig. 1C).

Des western blots ont ensuite été réalisés pour déterminer le profil de distribution relatif d'une protéine recrutée à partir du cytosol sur les endosomes, VPS26, ainsi que de la cathepsine D, une hydrolase lysosomale qui subit une maturation protéolytique au cours de son transport biosynthétique vers les endosomes et lysosomes.

Comme cité dans l'introduction de ce mémoire, VPS26 est un composant du complexe rétromère qui est recruté sur les endosomes pour recycler les protéines vers le réseau trans-Golgien. Après fractionnement des SK-N-BE par centrifugation différentielle, la protéine VPS26 est principalement retrouvée dans les fractions P (30%) et S (45%), avec une intensité



spécifique relative (ou ISR, mesure d'enrichissement) de 2,13 dans la fraction P (fig. 2A). La présence de la protéine dans le culot P composé d'organites membranaires sédimentés à un champ centrifuge élevé s'explique vraisemblablement par l'association de VPS26 avec des compartiments endosomaux.

La cathepsine D est une protéase aspartique lysosomale. Il a été renseigné, dans divers types cellulaires humains, que cette enzyme est synthétisée sous une forme précurseur d'approximativement 52 kDa qui est retrouvée majoritairement dans les compartiments biosynthétiques (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi). Lorsque l'enzyme accède aux endosomes, elle subit une maturation protéolytique en une forme intermédiaire d'approximativement 47 kDa qui est ensuite clivée en une chaîne légère (12 kDa, non détectée par western blotting) et en une chaîne lourde (27 kDa) qui restent attachées ensemble dans les lysosomes. En accord avec cette maturation dépendante du trafic intracellulaire de la protéine, après fractionnement des cellules SK-N-BE et analyse par western blotting, nous observons que la forme intermédiaire et la chaîne lourde de la cathepsine D sont enrichies dans la fraction L, tandis que la forme précurseur est clairement visible dans la fraction P et en peut-être en partie dans la fraction L, bien que la distinguer de la forme intermédiaire ne soit pas aisé (fig. 2B). Ces deux profils sont respectivement similaires aux profils de distribution observés pour le marqueur des lysosomes ( $\beta$ -gal) et pour celui du réticulum endoplasmique ( $\alpha$ -gluc) (fig. 1), ce qui est en accord avec les différentes étapes de la maturation de la cathepsine D.

Grâce à cette approche, nous avons pu établir que le fractionnement par centrifugation différentielle permet de répartir les organites subcellulaires des cellules SK-N-BE dans différentes fractions et que leurs profils de distribution sont distinguables les uns des autres. Cette technique est donc utilisable comme première approche pour faire une étude de la localisation subcellulaire de la protéine qui nous intéresse, la maspardine, dans des cellules d'origine neuronale.

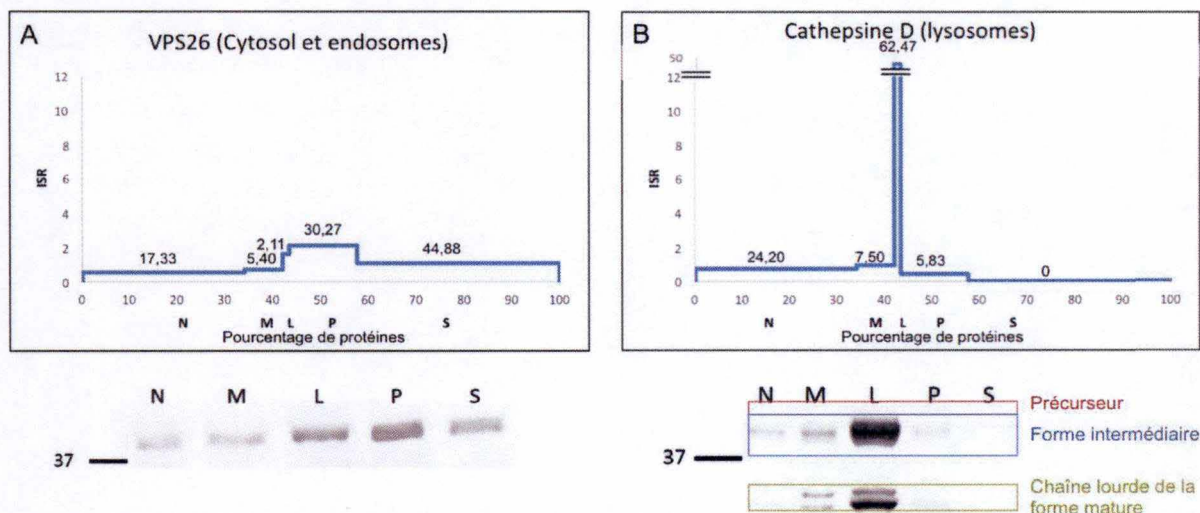


Figure 2 : Distribution de VPS26 et de la Cathepsine D dans les fractions des SK-N-BE. Des westerns blots ont été réalisés sur les fractions E, N, M, L, P et S obtenues via un fractionnement de cellules SK-N-BE par centrifugation différentielle (voir figure 1). Le blot montre les signaux obtenus lorsqu'une même quantité de protéines chargée pour chaque fraction. Les graphiques représentent les pourcentages de protéines cumulés (axe x) et l'intensité spécifique relative (ISR, axe y) calculés pour le marqueur endosomal et cytosolique VPS26 (A) et l'hydrolase lysosomale cathepsine D (le graphe montre le profil de distribution de la chaîne lourde qui compose la forme mature de cette protéase) (B). Le pourcentage d'activité de chaque marqueur dans chaque fraction est indiqué sur le graphe.



## 1.2. Analyse de la distribution de la maspardine après fractionnement de cellules SK-N-BE par centrifugation différentielle

La distribution de la maspardine a été analysée par western blotting dans les fractions décrites ci-dessus (pourcentage de récupération d'environ 80%). La maspardine est principalement retrouvée dans les fractions L, P et S (4,6% dans L, 25% dans P et 56% dans S, avec des ISR de respectivement 3,55, 1,8 et 1,31) (fig. 3). Cette distribution pourrait être indicative d'une localisation double, cytosolique d'une part et, au vu de son association lysosomale rapportée dans le foie de rat, probablement endolysosomale de l'autre. Afin de préciser la localisation de la protéine, nous avons décidé de combiner le protocole de fractionnement par centrifugation différentielle à une analyse de la distribution des organites membranaires après centrifugation dans un gradient de densité autoformé de Percoll (Graham J. M., 2001). L'utilisation d'une centrifugation dans ce gradient de densité a pour avantage de pouvoir séparer efficacement les organites les plus denses tels que les mitochondries, les lysosomes ou les peroxysomes, des autres compartiments subcellulaires (dont les endosomes, le réticulum endoplasmique, et l'appareil de Golgi). En effet, une solution de Percoll est constituée d'une mixture de billes de tailles différentes. Sous l'effet d'un champ centrifuge, la sédimentation différentielle de ces billes crée un gradient discontinu. Seuls les organites les plus denses seront capables d'avancer vers le fond du tube.

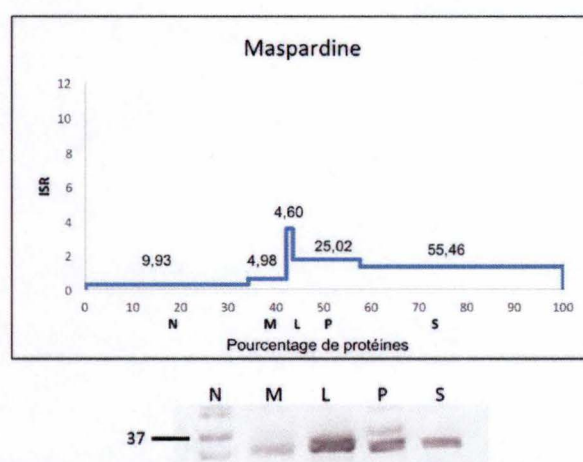


Figure 3 : Distribution de la maspardine dans les fractions des SK-N-BE. Des westerns blots ont été réalisés sur les fractions E, N, M, L, P et S obtenues via un fractionnement de cellules SK-N-BE par centrifugation différentielle (voir figure 1). Les graphiques représentent les pourcentages de protéines cumulés (axe x) et l'intensité spécifique relative (ISR, axe y) calculés pour notre protéine d'intérêt la maspardine. Le pourcentage d'activité dans chaque fraction est indiqué sur le graphe.

## 1.3. Analyse de la distribution de la maspardine et de protéines marqueurs de différents organites intracellulaires après centrifugation des organites intracellulaires des cellules SK-N-BE dans un gradient de densité Percoll auto-formé

Les fractions M, L et P obtenues par une application de la méthode décrite ci-dessus ont été rassemblées et chargées au-dessus d'une suspension de Percoll 18% préparée dans du saccharose isotonique et ajustée à un pH neutre avec du Tris-HCl 1M (pH=7,4). Après une centrifugation à un champ centrifuge de 25000 RPM pendant 45 minutes à 4°C, sept fractions ont été récupérées du haut vers le bas du tube collecteur (voir le matériel et méthodes pour plus d'informations). Comme pour le fractionnement par centrifugation différentielle, les pourcentages de récupération calculés pour les différentes enzymes marqueurs ont été mesurés et jugés acceptables (entre 85 et 115% de récupération).



Sur la fig. 4A, nous pouvons observer que la centrifugation permet de créer, comme attendu, un gradient de densité discontinu. En effet, la densité de la solution de Percoll augmente légèrement jusqu'à la fraction numéro 3. Cette densité atteint ensuite une phase plateau entre les fractions 3 et 6 pour augmenter à nouveau dans la septième fraction. D'après des études publiées réalisées sur d'autres types cellulaires, c'est dans cette dernière fraction que sont généralement retrouvées les protéines associées avec des organites de haute densité comme les lysosomes, tandis que les compartiments moins denses et pré-lysosomaux tels que les endosomes, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, restent dans la partie supérieure du gradient de densité (Green S.A. *et al*, 1987). En accord avec cette séparation attendue, le profil de distribution du marqueur lysosomal  $\beta$ -gal parmi les sept fractions (fig. 4B) montre un haut pourcentage d'activité dans la septième fraction (approximativement 53% de l'activité totale). Au contraire, les profils de distribution de la catalase (peroxysomes) et de l' $\alpha$ -gluc (glucosidase alcaline, réticulum endoplasmique) (fig. 4C et 4D) montrent la présence de ces deux enzymes principalement dans les trois premières fractions. Le profil de distribution de la PDase (membrane plasmique) (fig. 4E) montre une présence de l'enzyme dans la septième fraction (approximativement 17%). Cependant, la majorité de la population de l'enzyme est retrouvée dans les trois premières fractions (approximativement 50%).

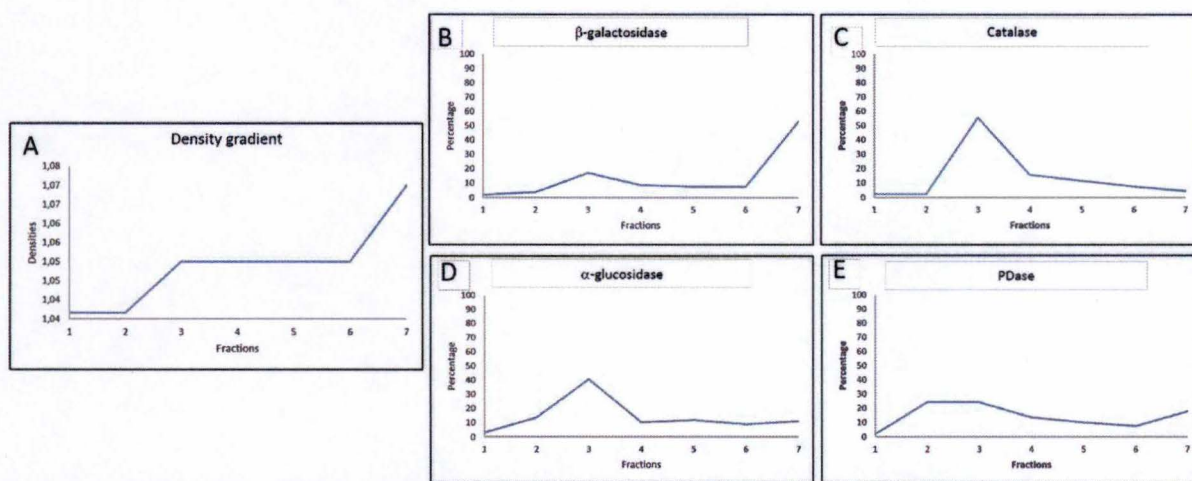


Figure 4 : Fractionnement subcellulaire de cellules SK-N-BE dans un gradient de densité de Percoll. Une fraction composée à partir des fractions individuelles M, L et P a été chargée au dessus d'une solution de 18% de Percoll. Après centrifugation, une évaluation de la densité (A) et des tests enzymatiques (B à E) ont été réalisés sur les sept fractions collectées. Les graphiques B à E présentent le pourcentage de chaque enzyme marqueur dans chaque fraction. B :  $\beta$ -galactosidase/lysosomes. C : Catalase/péroxisomes. D :  $\alpha$ -glucosidase/réticulum endoplasmique. E : Phosphodiesterase alcaline (PDase)/membrane plasmique.

VPS26 se trouve principalement dans les trois premières fractions du gradient de Percoll (approximativement 93%), ce qui est en accord avec le fait que les endosomes sont moins denses que les lysosomes (fig. 5A).

La forme intermédiaire et la chaîne lourde de la cathepsine D sont retrouvées surtout dans la septième fraction du gradient Percoll (approximativement 90%), suggérant que la cathepsine D se trouve principalement sous une forme active (intermédiaire et sous la forme clivée en chaîne lourde et légère) dans les lysosomes (fig. 5B). La forme précurseur n'est pas suffisamment visualisable pour que son signal soit quantifiable.



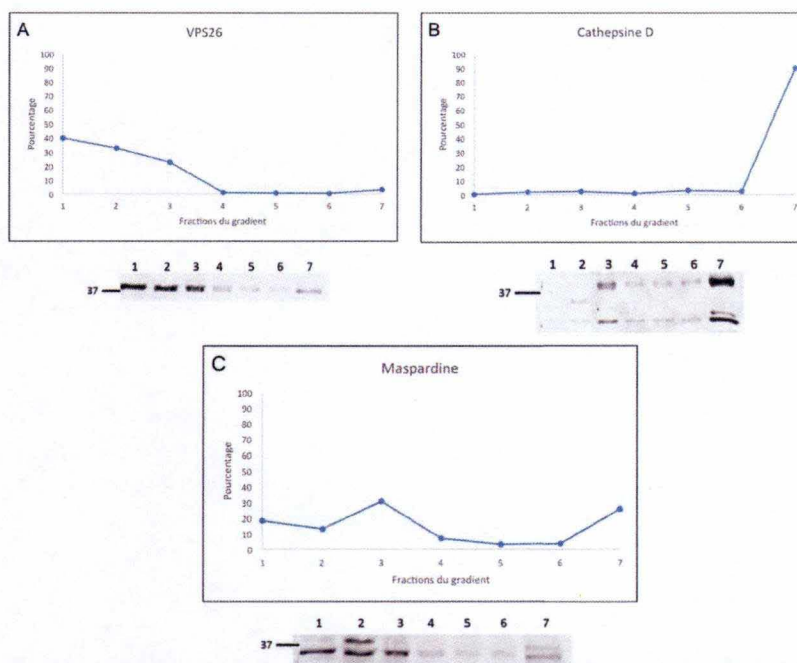


Figure 5 : Distribution de la maspardine, de VPS26 et de la cathepsine D après un fractionnement de cellules SK-N-BE dans un gradient de densité de Percoll. Des western blots ont été réalisés sur les fractions 1 à 7 du gradient de densité Percoll décrit dans la figure 3. Les graphiques représentent le pourcentage de VPS26 (A), de la cathepsine D (le graphe montre les pourcentages de chaîne lourde et de forme intermédiaire) (B) et de la maspardine (C) dans chaque fraction. Les quantités de protéines chargées sont identiques dans chaque puit.

Quant à la maspardine (pourcentage de récupération d'approximativement 75%), approximativement 60% de sa population est retrouvée dans les trois premières fractions du gradient Percoll et près de 25% du signal peut être observé dans la septième fraction (fig. 5C). L'explication la plus probable nous semble être qu'une partie de la maspardine se localise dans ou sur les lysosomes qui sédimentent dans le fond du gradient étant donné que la localisation d'une partie de la population des protéines maspardine sur les lysosomes a déjà été démontrée dans le foie de rat (Jadot M. *et al.*, 2017). Nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité qu'une petite fraction de la population de maspardine ne se localise au niveau de la membrane plasmique qui est aussi retrouvée en partie dans la fraction la plus dense du gradient. Il est intéressant de noter qu'une partie de la population sédimentable (trouvée dans M+L+P) de la maspardine semble également associée à des organites moins denses que les lysosomes, qui pourraient être des endosomes et/ou des compartiments biosynthétiques qui demeurent dans la zone de faible densité du gradient. Notons enfin qu'une petite partie du signal se retrouve au sommet du gradient et pourrait correspondre à de la maspardine qui se serait détachée de la périphérie des lysosomes lors de la centrifugation, ou d'autres organites, lorsque ces derniers ont pénétré dans le gradient de densité.

#### 1.4. Analyse de la présence de la maspardine dans de petites vésicules membranaires

Notre hypothèse étant que la maspardine pourrait être impliquée dans le trafic vésiculaire, nous nous sommes demandé si une partie de la population de la maspardine trouvée dans la fraction S (voir fig. 3) pourrait être associée avec des petites vésicules de transport qui ne sédimentent pas à la force centrifuge utilisée pour obtenir le culot correspondant à la fraction P. Pour tester cette possibilité, un fractionnement subcellulaire complet par centrifugation différentielle (tel que développé plus haut) avec une étape supplémentaire a été réalisé. Cette étape supplémentaire consiste en une centrifugation à un champ centrifuge de 270 000xg de la fraction S pendant 30 minutes à 4°C. De ce fait, nous obtenons deux fractions supplémentaires par rapport à un fractionnement classique : le surnageant de S (désigné SS) et



le culot de S (désigné SC) (tableau 1). Tandis que la fraction SS contient vraisemblablement des protéines solubles ou des vésicules avec un haut rapport de concentrations lipides/protéines, les protéines associées avec des petites vésicules membranaires ou des agrégats protéiques de haute densité devraient se retrouver dans la fraction SC. Les résultats montrés ci-dessous proviennent d'une expérience unique réalisée à la suite d'un fractionnement par centrifugation différentielle classique sur des cellules SK-N-BE.

A		DPPIII		B		VPS26	
		S=83% du total				S=73% du total	
		Pourcentage de S				Pourcentage de S	
SC		0,68		SC		0,23	
SS		99,32		SS		99,77	

C		maspardine	
		S=46% du total	
		Pourcentage de S	
SC		14,89	
SS		85,11	

Tableau 1 : **Centrifugation à grande vitesse de la fraction soluble (S).** La fraction S récoltée à partir de cellules SK-N-BE (voir figure 1) a été centrifugée à 270 000g pendant 30 minutes. Des tests enzymatiques et des western blots ont été réalisés sur le culot (SC) et le surnageant (SS) obtenus. La quantité de protéines (pourcentage) mesuré dans chaque fraction a été résumée dans les tableaux. A : Dipeptidyl-aminopeptidase III (DPPIII)/cytosol. B : VPS26/endosomes. C : maspardine. Le pourcentage de ces protéines dans la fraction S de départ est indiqué au dessus de chaque tableau.

Comme attendu pour une protéine soluble cytosolique, la DPPIII est principalement récupérée dans la fraction SS (99% de la quantité totale retrouvée dans la fraction S) (tableau 1A). Alors que VPS26 est décrit comme étant en partie associée avec des petites vésicules dans la littérature, la protéine est retrouvée presque exclusivement dans la fraction SS (99,8%) (tableau 1B). Ceci pourrait être expliqué par le fait que, à l'état stationnaire, la population de VPS26 cytosolique est principalement sous une forme soluble et que la fraction de la protéine en transit dans de petites vésicules est probablement peu importante quantitativement à l'état basal. Une autre explication pourrait être un détachement de VPS26 à partir de ces vésicules lors de la centrifugation.

De manière surprenante, au contraire de VPS26 et de la DPPIII, 15% de la maspardine associée à la fraction S sont retrouvés dans la fraction SC (tableau 1C). Ces résultats pourraient signifier que la maspardine est partiellement associée avec des petites vésicules même si la majorité de la protéine est soluble dans le cytosol.

### 1.5. Fractionnement subcellulaire de cellules HeLa

Nous avons donc décidé d'utiliser des cellules HeLa pour la suite des expériences. En effet, les mécanismes de transport intracellulaire dans les cellules HeLa sont mieux décrits dans la littérature que dans les neurones car ils sont moins spécifiques. Les neurones possèdent un axone parfois d'une longueur non négligeable et le long duquel le transport est continu et bidirectionnel. Ces spécificités cellulaires font des neurones un modèle cellulaire dans lequel l'étude biochimique des mécanismes de transports vésiculaires peut être difficile.

Des expériences précédemment réalisées par notre équipe, et par d'autres, montrent que les cellules HeLa peuvent être aisément utilisées comme modèle expérimental de surcharges lysosomales et d'analyse du trafic intracellulaire de protéines endosomales et lysosomales. En effet, ces cellules sont sensibles à divers traitements qui induisent des surcharges dans les lysosomes. Ce modèle nous semble adapté à notre objectif qui est, à terme, d'identifier la fonction de la maspardine dans le système endolysosomal. Notons aussi que les fractionnements classiques sur cellules SK-N-BE nécessitent un grand nombre de boîtes de Petri par condition, nombre qui peut être réduit en travaillant sur des cellules HeLa.



Nous avons souhaité tirer parti de cette approche pour observer si la maspardine subit un changement de localisation, entre sa forme liée aux lysosomes et celle soluble dans le cytoplasme, lors de l'accumulation anormale de matériel dans les lysosomes. En effet, si la maspardine est un acteur de la biogenèse ou du maintien du compartiment lysosomal, il est fort possible qu'une perturbation de l'homéostasie lysosomale par induction d'une surcharge provoque une redistribution de la protéine. Afin de réaliser ces expériences, l'utilisation d'un traitement induisant une surcharge lysosomale était requise. Nous avons souhaité, dans un premier temps, mettre au point une technique nécessitant une quantité de matériel (nombre de boîtes de Petri) qui ne soit pas trop importante. La méthode utilisée sur les cellules HeLa est un fractionnement « en eppendorfs ». Cette technique requiert des volumes beaucoup moins élevés que le fractionnement classique que nous avons utilisé jusqu'ici, et nous pouvons nous contenter de récupérer une fraction MLP au lieu des fractions séparées M, L et P car notre but est, dans un premier temps, d'observer les changements de localisation éventuels de la maspardine entre des compartiments membranaires et le cytosol.

Pour commencer, nous avons souhaité connaître le profil de distribution dans les cellules HeLa de certains marqueurs testés précédemment sur les cellules SK-N-BE : la  $\beta$ -gal, la DPPIII, VPS26, LAMP2 (une protéine de la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes) et notre protéine d'intérêt, la maspardine (fig. 6). Ceci a pour but de pouvoir connaître les profils de distribution dans les cellules HeLa en conditions normales afin d'avoir un point de comparaison avec ceux analysés dans la seconde partie de ce mémoire, concernant les cellules HeLa soumises à divers traitements. Les résultats décrits dans le paragraphe suivant proviennent d'un fractionnement en eppendorfs représentatif.

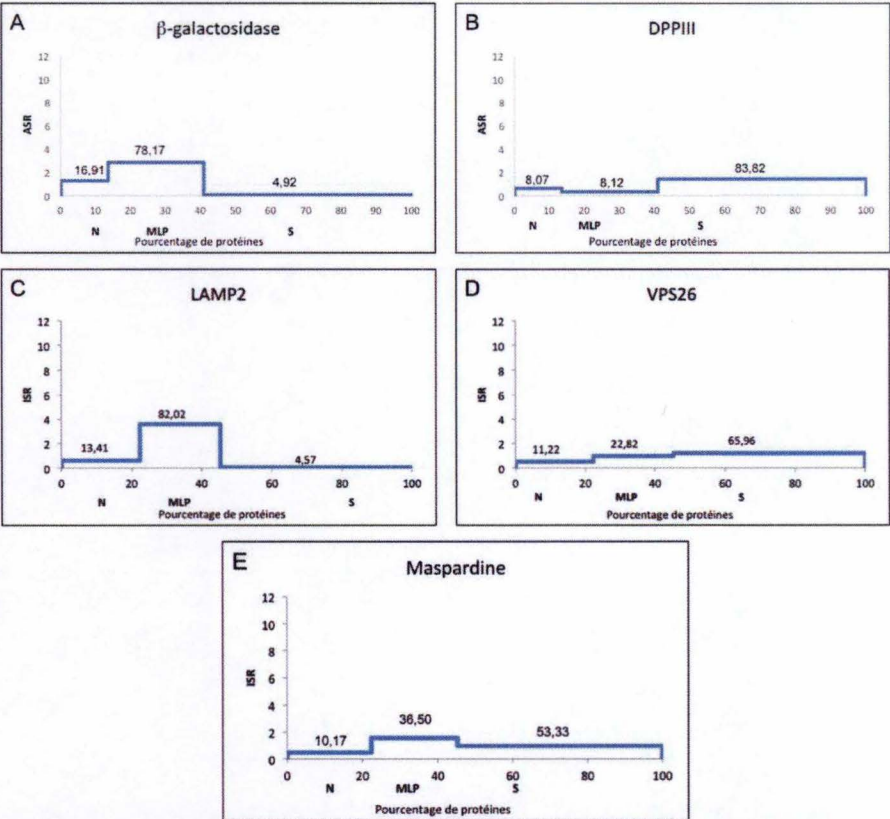


Figure 6 : Fractionnement subcellulaire de cellules HeLa. Des cellules HeLa ont été homogénéisées et les fractions N, MLP et S ont été préparées comme cela est décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les graphiques représentent l'activité spécifique relative ou intensité (ASR ou ISR) de la  $\beta$ -galactosidase/lysosomes (A), la Dipeptidyl-aminopeptidase III (DPPIII)/cytosol (B), LAMP2/endosomes tardifs et lysosomes (C), VPS26/endosomes et cytosol (D) et la maspardine (E) comparés aux pourcentages de protéines cumulés.



Le profil de distribution de la  $\beta$ -gal montre une activité plus élevée dans la fraction MLP (environ 78%) avec seulement environ 5% dans la fraction S (fig. 6A), ce qui coïncide avec les résultats observés dans les cellules SK-N-BE (fig. 1A). La DPPIII, comme attendu d'une protéine soluble cytosolique, est retrouvée principalement dans la fraction S (84%) et seulement 8% de son activité est détectée dans la fraction MLP (fig. 6B).

De la même façon, LAMP2 (lysosome-associated membrane protein 2), qui est une glycoprotéine liée à la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes, est principalement retrouvée dans la fraction MLP (environ 82%) tandis que VPS26 est surtout retrouvée dans la fraction S (environ 66%) et en partie dans la fraction MLP (23%), probablement reflétant son association sur des endosomes (respectivement fig. 6C et 6D).

La maspardine est principalement observée dans la fraction MLP (environ 37%) et dans la fraction S (environ 53%) avec un léger enrichissement dans la fraction MLP (fig. 6E). Ces résultats sont compatibles avec la localisation supposée de la maspardine au niveau du système endolysosomal et dans le cytosol.

En conclusion, les profils de distribution de la  $\beta$ -gal, de la DPPIII et de LAMP2 dans les cellules HeLa coïncident avec ce qui a pu être observé dans les cellules SK-N-BE et avec les profils obtenus par d'autres membres de l'équipe lorsque les cellules HeLa sont soumises à un fractionnement « classique ». Les profils de distribution de la maspardine dans les deux types cellulaires sont également fort semblables (fig. 3 et 6E). Nous avons donc décidé d'utiliser les cellules HeLa comme modèle cellulaire pour les tests de surcharge lysosomale.

## **2. Etude de la localisation de la maspardine lors d'une surcharge lysosomale ou d'activation de l'autophagie**

Les gènes codant pour des protéines impliquées dans les fonctions lysosomales font pour la plupart partie du réseau CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression And Regulation) dont le facteur de transcription majeur est TFEB. Près de 472 de ces gènes possèdent dans leur région promotrice une séquence appelée la séquence « CLEAR » (Settembre C. *et al.*, 2015 ; Napolitano G. *et al.*, 2016).

Il a été observé que le gène codant pour la maspardine possède également cette séquence « CLEAR » dans sa région promotrice (Sardiello M. *et al.*, 2009).

MTORC1, le complexe de protéines le plus connu, associé à la face externe de la membrane du lysosome, fait partie du réseau CLEAR. Ce complexe est impliqué dans la régulation de la réponse cellulaire qui se met en place en cas de surcharge lysosomale ou en condition de jeûne. En effet, dans ces conditions, l'association/dissociation du complexe MTORC1 avec la membrane lysosomale est perturbée, ce qui modifie le niveau d'activation du facteur de transcription TFEB dans le cytosol. La fraction de MTORC1 associée à la membrane lysosomale par rapport à celle présente dans le cytosol est donc un facteur clef de la régulation du réseau CLEAR (Madrigal-Matute J. *et al.*, 2016 ; Menzies F. M. *et al.*, 2017 ; Seranova E. *et al.*, 2017).

Afin de collecter d'éventuels indices concernant la fonction de la maspardine, nous avons voulu observer si le pourcentage de maspardine sur les lysosomes et celui dans le cytosol est impacté par l'induction d'une surcharge lysosomale ou d'une période de jeûne comme cela est le cas pour MTORC1. Dans un deuxième temps, nous avons décidé d'analyser si ces deux conditions, connues comme modifiant la biologie du lysosome, provoquent un changement d'expression du gène codant pour la maspardine afin de vérifier son appartenance « fonctionnelle » au réseau CLEAR.



## 2.1. Distribution intracellulaire des marqueurs subcellulaires et de la maspardine dans des cellules HeLa non traitées et traitées

Les traitements que nous avons réalisés sur les cellules HeLa sont une exposition au saccharose (100 mM dans le milieu de culture) pendant 24h ou 48h, afin d'induire une forme de surcharge lysosomale (Higuchi T. *et al.*, 2015), et une période de jeûne de 4h.

La première expérience réalisée sur ces cellules est un fractionnement « en eppendorfs » et les profils de distribution des enzymes marqueurs des fractions MLP et S ont ensuite été analysés par dosage enzymatique et western blotting comme décrit précédemment sur les cellules SK-N-BE (chapitre 1.5).

### 2.1.1. Cellules HeLa non traitées et traitées avec du saccharose pendant 24h

Après fractionnement réalisé de cellules HeLa non traitées et traitées 24h au saccharose, les activités des enzymes marqueurs, la  $\beta$ -galactosidase et la DPPIII ont été dosées et l'intensité de LAMP2 ainsi que de la maspardine, notre protéine d'intérêt, a été mesurée par western blotting dans les différentes fractions (N, MLP et S).

Des tests statistiques ont ensuite été réalisés sur les résultats obtenus par ces différentes techniques afin de tester si le traitement au saccharose pendant 24h induit un changement de localisation significatif. Les tests ont été réalisés sur deux paramètres mesurés pour les trois marqueurs et la maspardine : le pourcentage d'activité/intensité ou l'activité/intensité spécifique relative (ASR/ISR) dans une fraction donnée. Nous avons aussi analysé si le traitement change drastiquement la répartition des protéines en général en comparant les pourcentages de protéines totales au sein des fractions.

Chaque panneau de la figure 7 représente le pourcentage de protéines total ou l'un des deux paramètres pour chaque protéine dans chaque fraction. Les cellules HeLa non traitées sont représentées par les colonnes bleues et les cellules HeLa traitées au saccharose pendant 24h sont en rouge. La p-valeur obtenue par le test statistique est écrite entre parenthèses à côté de la fraction dans laquelle elle a été calculée.

Le pourcentage de protéines totales dans chaque fraction ne semble pas varier de manière significative entre les conditions contrôle et traitées au saccharose (fig. 7A). Cette observation est également valable pour les activités/intensités relatives des marqueurs utilisés, quelle que soit la fraction considérée sauf pour la  $\beta$ -galactosidase. Nous remarquons en effet que le pourcentage d'activité (fig. 7D) et l'activité spécifique relative (soit le niveau d'enrichissement de l'enzyme par rapport aux protéines totales présentes dans une fraction donnée) (fig. 7E) de la  $\beta$ -galactosidase dans la fraction S semblent augmenter significativement après exposition des cellules au saccharose (de 5,33% à 8,27% ;  $p=0,04$  et de 0,11 à 0,18 ;  $p=0,044$  respectivement).

Le traitement au saccharose pendant 24h ne révèle aucune différence significative pour les paramètres de la maspardine (fig. 7H et 7I).

Le saccharose induit une surcharge lysosomale qui est connue comme s'amplifiant avec le temps. Nous avons donc décidé de réaliser la même expérience avec des cellules HeLa soumises au saccharose pendant 48h cette fois.



### 2.1.2. Cellules HeLa non traitées et traitées avec du saccharose pendant 48h

La méthode utilisée lors de cette expérience est identique à celle précédemment énoncée mais avec une exposition au saccharose (100 mM) prolongée à 48h. Les tests statistiques ont été conduits de façon similaire à ceux sur les HeLa traitées 24h au saccharose (fig. 8).

Dans ces conditions de traitement, le pourcentage total de protéines dans la fraction N semble augmenter (de 13,07% à 23,07% ;  $p=2,14.10^{-5}$ ) au détriment de la fraction MLP (de 41,4% à 32,36% ;  $p=4,66.10^{-5}$ ) de façon très hautement significative (fig. 8A).

Le pourcentage d'activité (fig. 8B) et l'activité spécifique relative (fig. 8C) de la DPPIII ne varient pas de façon significative ( $p=0,098$  et  $p=0,13$ ) après un traitement de 48h au saccharose.

Le pourcentage d'activité (fig. 8D) et l'activité spécifique relative (fig. 8E) de la  $\beta$ -galactosidase dans la fraction S augmentent de manière très hautement significative (de 7,29% à 23,48% avec  $p=4,5.10^{-4}$  et de 0,16 à 0,52 avec  $p=4,7.10^{-4}$ , respectivement), en accord avec ce que nous avons déjà observé après 24h de traitement (fig. 7D et 7E).

En contrepartie, le pourcentage d'activité et l'activité spécifique relative de la  $\beta$ -galactosidase dans la fraction MLP diminuent de manière très hautement significative (de 78,27% à 65,36% ;  $p=5,5.10^{-4}$ ) (fig. 8D) et significative (de 2,2 à 1,88 ;  $p=0,025$ ) (fig. 8E), respectivement. Aucune différence significative n'avait pu être observée pour ces paramètres après 24h d'exposition au saccharose. Il est probable que ce déplacement de la  $\beta$ -galactosidase vers la fraction S représente la rupture de quelques lysosomes fragilisés par le traitement.

Etonnamment pour une protéine membranaire, l'intensité spécifique relative de LAMP2 augmente significativement dans la fraction S (de 0,04 à 0,25 ;  $p=0,042$ ) après une exposition de 48h au saccharose (fig. 8G), ce qui s'explique principalement par le fait que le pourcentage de LAMP2 augmente significativement dans la fraction S (de 1,96% à 11,36% ;  $p=0,043$ ) au détriment de la fraction MLP (de 83,88% à 72,69% ;  $p=0,056$ ) (fig. 8F). Le pourcentage de LAMP2 ne varie pas de façon significative dans la fraction N ( $p=0,35$ ) (fig. 8F). Nous détaillerons nos hypothèses pour expliquer cette observation dans la partie discussion de ce mémoire.

La distribution des pourcentages de la maspardine ne semble pas varier de façon significative, quelque soit la fraction (fig. 8H). L'intensité spécifique relative de la maspardine semble cependant augmenter de façon significative dans la fraction MLP (de 0,45 à 0,85 ;  $p=0,023$ ) (fig. 8I), une conséquence de la moindre concentration des protéines totales dans cette fraction lorsque les cellules sont traitées (fig. 8A).

### 2.1.3. Cellules HeLa non traitées et soumises à un jeûne de 4h

La méthode utilisée lors de cette expérience est identique à celle précédemment énoncée mais dans la condition « test », les cellules sont soumises à un jeûne en remplaçant le milieu de culture par de l'HBSS pendant 4h (fig. 9).

Le traitement ne provoque pas de modification importante de la répartition des protéines totales (fig. 9A), ni sur le pourcentage d'activité (fig. 8B) ou sur l'activité spécifique relative (fig. 9C) de la protéine cytosolique DPPIII.

Le pourcentage d'activité de la  $\beta$ -galactosidase augmente de façon hautement significative dans la fraction N (de 15,85% à 23,1% ;  $p=0,0028$ ) et diminue de façon très hautement significative dans la fraction MLP (de 77,27% à 69,34% ;  $p=3,9.10^{-4}$ ) (fig. 9D) sans que cela



ne se traduise par une différence significative des ASR mesurées dans les trois fractions (fig. 9D-E).

Une situation comparable est observée pour ce qui concerne LAMP2 dont le pourcentage augmente significativement dans la fraction N (de 13,6% à 19,96% ;  $p=0,014$ ) et diminue de façon significative dans la fraction MLP (de 81,77% à 77,77% ;  $p=0,048$ ) (fig. 9F). Nous évoquerons les raisons possibles de ce déplacement dans la partie discussion de ce mémoire. Notons simplement ici que, contrairement à la surcharge lysosomale, le jeûne ne semble pas induire de rupture de lysosomes.

Dans ces conditions expérimentales, la maspardine subit la redistribution la plus nette, conduisant à une diminution importante de son pourcentage dans la fraction MLP (de 21,43% à 10,42% ;  $p=0,037$ ) (fig. 9H) et à une augmentation de son intensité spécifique relative dans la fraction non sédimentable (de 1,58 à 2,03 ;  $p=0,021$ ) (fig. 9I). Rappelons que la maspardine est une protéine très probablement associée à la surface externe du lysosome et partiellement présente dans le cytosol. Nos résultats pourraient signifier que le jeûne provoque une redistribution de la maspardine vers le cytosol au détriment de sa sous-population lysosomale lorsque la cellule est privée de nutriments.

## **2.2. Analyse de l'expression de marqueurs autophagiques après un traitement au saccharose ou après induction d'un jeûne**

Les observations quant à la localisation de la maspardine lors d'une surcharge lysosomale et après une période de jeûne sont « opposées ». En effet, la population de la maspardine associée aux lysosomes semble augmenter en cas de surcharge et diminuer en cas de jeûne. Il a déjà été montré dans la littérature que l'induction d'une surcharge lysosomale, surtout via l'utilisation de saccharose, peut conduire à une perturbation du flux d'autophagie (Seranova E. *et al.*, 2017 ; Parenti G. *et al.*, 2015). Ceci nous a mené à nous intéresser à l'impact de nos traitements (jeûne et surcharge induite par le saccharose) sur le processus autophagique. Pour ce faire, nous avons décidé d'utiliser le « marqueur autophagique » LC3. Cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois avant la fin de mon stage de mémoire.

Les lysats des cellules contrôles et traitées ont été analysés par western blotting en révélant la protéine LC3. LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) est une protéine couramment utilisée comme marqueur de l'autophagie. Cette protéine présente deux formes : LC3-1 et LC3-2. LC3-1 est la forme cytosolique de la protéine. Lors de l'autophagie, les autophagosomes emprisonnent des molécules cytosoliques, comme LC3-1. LC3-1 se conjugue alors à la phosphatidyl-éthanolamine à l'intérieur des autophagosomes, ce qui donne lieu à l'apparition de la forme LC3-2. Le rapport de concentration des formes LC3-1 et LC3-2 constitue donc un indicateur de la séquestration autophagique car la présence de LC3-2 est corrélée avec le nombre d'autophagosomes présents dans la cellule (Tanida I. *et al.*, 2007 ; Mizushima N. *et al.*, 2007).

Comme nous pouvons l'observer dans le tableau 2 et sur la fig. 10, le rapport de LC3-1 sur LC3-2 donne un résultat inférieur à 1 dans toutes les conditions expérimentales. Ce résultat est indicatif de l'existence d'un processus autophagique chez les cellules traitées comme chez les cellules contrôles. Il est également intéressant à noter que les quantités de LC3-1, LC3-2 et LC3 total augmentent lors d'un traitement saccharose par rapport aux cellules non traitées. Au contraire, ces quantités tendent à diminuer lors d'un jeûne.

La condition de jeûne testée, c'est-à-dire une incubation des cellules en présence d'HBSS, n'est-elle pas optimale au vu des résultats observés par rapport aux cellules non



traitées. Il serait judicieux de tester d’autres méthodes permettant la mise en place d’un jeûne plus drastique.

Il est important de noter que les traitements ont été réalisés sans ajout d’inhibiteurs de protéases lysosomales. Or, LC3-2 est dégradée par les protéases présentes dans les autophagolysosomes, ce qui peut fausser le résultat. Il serait dès lors peut-être intéressant de réaliser à nouveau ce type d’expérience dans des conditions plus optimales, par exemple en ajoutant de la bafilomycine, un agent bloquant l’acidification des lysosomes et donc l’activité des enzymes lysosomales, ou en mesurant l’intensité d’un autre marqueur de l’étape d’exécution autophagique, tel que p62.

A		signal LC3-1	signal LC3-2	Rapport LC3-1/LC3-2
Non traitées		2.405.841	3.102.355	0,78
Saccharose		3.522.497	9.891.740	0,36
Jeûne		1.224.891	1.781.305	0,69

B		LC3-1 normalisé	LC3-2 normalisé	LC3 total normalisé	Rapport LC3-1/LC3-2
Non traitées		1	1	1	1
Saccharose		1,46	3,19	2,44	0,46
Jeûne		0,51	0,57	0,55	0,89

Tableau 2 : Expression du marqueur d’autophagie LC3 dans des cellules HeLa non traitées ou traitées au saccharose (100 mM pendant 48h) ou soumises à un jeûne (HBSS pendant 4h). Des western blots ont été réalisés sur des lysats de cellules HeLa traitées ou non (voir la section Matériel et Méthodes) pour révéler le marqueur LC3 sous les deux formes LC3-I (19 kDa) et LC3-II (17 kDa). A : signaux bruts de LC3-I et LC3-II observés par le logiciel ImageJ ainsi que le rapport LC3-I/LC3-II dans chaque condition. B : valeurs de LC3-I, LC3-II et LC3 total lors des deux traitements normalisées par rapport à celles des cellules non traitées (chaque forme est normalisée à 1 dans les cellules non traitées).

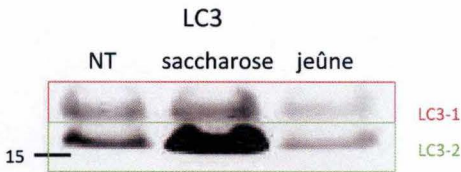


Figure 10 : Expression du marqueur d’autophagie LC3 dans des cellules HeLa non traitées ou traitées au saccharose (100 mM pendant 48h) ou soumises à un jeûne (HBSS pendant 4h). Western blot révélant LC3-I et LC3-II dans les cellules non traitées, traitées 48h au saccharose ou soumises à un jeûne de 4h. L’encadré rouge correspond à la forme LC3-I et l’encadré vert à la forme LC3-II.

### 2.3.Expression de gènes qui appartiennent au réseau CLEAR et du gène codant pour la maspardine lors d’une surcharge lysosomale ou en condition de jeûne

Comme signalé au début de ce chapitre 2, la maspardine semble faire partie du réseau CLEAR, dans la mesure où la séquence consensus cible du facteur de transcription TFEB est trouvée dans la région promoteur du gène codant pour la maspardine.

Nous avons souhaité déterminer si l’expression du gène codant pour la maspardine variait de la même façon que les marqueurs avérés du réseau CLEAR (TFEB, cathepsine D et LAMP1) dans des conditions propices à l’activation de TFEB, à savoir une surcharge lysosomale ou une stimulation de l’autophagie. Pour ce faire, nous avons eu recours aux traitements utilisés précédemment (exposition au saccharose et situation de jeûne) afin de tester l’hypothèse d’une appartenance « fonctionnelle » de la maspardine au réseau CLEAR. Nous avons utilisé la protéine de membrane lysosomale LAMP2 comme contrôle, sachant que cette protéine ne fait pas partie du réseau CLEAR (Palmieri M. *et al.*, 2011). Par ailleurs, nous avons décidé d’observer si l’expression du gène codant pour la maspardine variait comme les marqueurs du réseau CLEAR dans une autre condition d’induction de l’autophagie, c’est-à-dire un traitement des cellules à l’aide de torine qui sera décrite plus en détails dans le point (2.3.2).



### 2.3.1. Cellules HeLa non traitées et traitées avec du saccharose pendant 24h ou 48h

L'expression génique de la maspardine et des éléments du réseau CLEAR a été mesurée par RT-qPCR. L'expérience a été réalisée une seule fois en triplicats (réplicats techniques) (fig. 11). Lorsqu'elles sont inférieures à 0,5 ou supérieures à 2, les valeurs de ces triplicats sont considérées comme sortant du bruit de fond dû à la sensibilité de la technique. Pour chaque gène, le niveau d'expression des cellules non traitées est arbitrairement placé à 1. L'expression dans les cellules traitées est exprimée en nombre de fois d'augmentation ou de diminution par rapport au niveau d'expression mesuré dans les cellules non traitées.

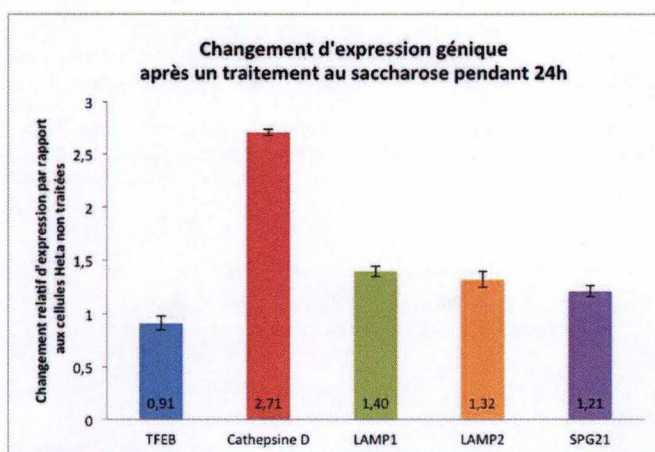


Figure 11 : Analyse de l'expression génique de marqueurs du réseau CLEAR, de *LAMP2* et de *SPG21* (qui code pour la maspardine) entre des cellules HeLa non traitées et des cellules exposées à du saccharose 100 mM pendant 24h par RT-qPCR. Les expressions géniques de *TFEB* (facteur de transcription majeur du réseau CLEAR qui lui-même fait partie de ce réseau), de la *CTSD* (cathepsine D) et de *LAMP1* (deux autres éléments du réseau CLEAR) ainsi que de *LAMP2* (non inclus dans le réseau CLEAR) et de la maspardine ont été mesurées par RT-qPCR après un traitement avec du saccharose pendant 24h. Les valeurs mesurées ont été normalisées par rapport à celles de cellules HeLa non traitées pour donner les changements relatifs d'expression par rapport à ces cellules. Vu que l'expérience a été réalisée en triplicats (techniques), le graphe représente la moyenne et l'écart-type de ces changements relatifs pour chaque marqueur.

L'expression du gène codant pour la protéine TFEB ne semble pas modifiée par un traitement de 24h au saccharose ( $m=0,91$ ). L'augmentation de l'expression de *LAMP1* codant pour une protéine membranaire endolysosomale ( $m=1,4$ ) est modeste et comparable à celle observée pour *LAMP2* ( $m=1,32$ ). Par contre, l'expression du gène codant pour la cathepsine D (*CTSD*) est fortement augmentée (de presque trois fois) par le traitement de 24h au saccharose ( $m=2,71$ ).

L'expression du gène codant pour la maspardine (*SPG21*) ne montre qu'une légère augmentation ( $m=1,21$ ) dans ces conditions de traitement.



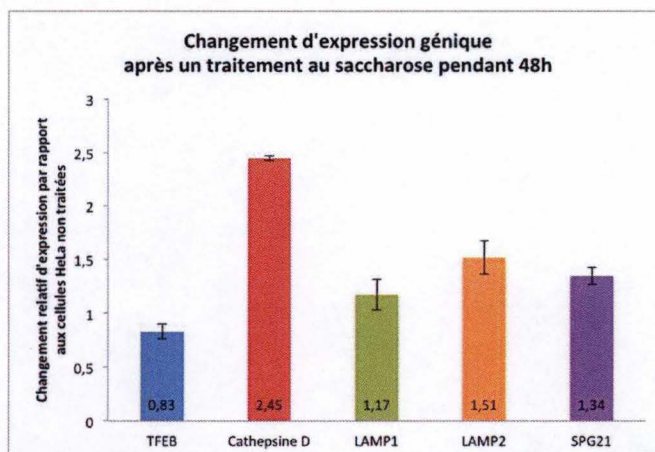


Figure 12 : Analyse de l'expression génique de marqueurs du réseau CLEAR, de *LAMP2* et de *SPG21* entre des cellules HeLa non traitées et des cellules exposées à du saccharose 100 mM pendant 48h par RT-qPCR. Les expressions géniques de *TFEB* (facteur de transcription majeur du réseau CLEAR qui lui-même fait partie de ce réseau), de la *CTSD* (cathepsine D) et de *LAMP1* (deux autres éléments du réseau CLEAR) ainsi que de *LAMP2* (non inclus dans le réseau CLEAR) et de la maspardine ont été mesurées par RT-qPCR après un traitement avec du saccharose pendant 48h. Les valeurs mesurées ont été normalisées par rapport à celles de cellules HeLa non traitées pour donner les changements relatifs d'expression par rapport à ces cellules. Vu que l'expérience a été réalisée en triplicats (techniques), le graphe représente la moyenne et l'écart-type de ces changements relatifs pour chaque marqueur.

Les mêmes expériences ont été réalisées après 48h de traitement au saccharose. Comme le montre la figure 12, les degrés d'expression observés suite au traitement de 48h au saccharose sont fort semblables à ceux mesurés après 24h, la cathepsine D étant à nouveau la protéine la plus impactée par le saccharose.

### 2.3.2. Cellules HeLa non traitées et soumises à un jeûne pendant 2h ou traitées avec de la torine

Nous avons analysé l'expression des ARNm des marqueurs du réseau CLEAR et de la maspardine dans des cellules HeLa non traitées et soumises à un jeûne de 2 heures. Ce jeûne a été provoqué par la privation des cellules aux nutriments contenus dans le sérum du milieu de croissance en remplaçant ce dernier par de l'HBSS (fig. 13).

Comme énoncé précédemment, MTORC1 fait partie du réseau CLEAR et ce complexe joue un rôle clef dans la régulation transcriptionnelle médiée par TFEB. Afin de compléter notre analyse de l'expression génique des différents marqueurs et de la maspardine en situation d'autophagie induite, nous avons décidé d'observer l'impact d'un traitement des cellules avec de la torine (fig. 14), un inhibiteur de MTORC1 agissant par compétition pour son site de liaison à l'ATP (Thoreen C. *et al.*, 2009).

Aucune différence d'expression n'a été observée pour les marqueurs ni pour la maspardine après une période de jeûne de 2h (fig. 13).

Après un traitement à la torine, l'expression du gène codant pour la cathepsine D augmente de presque deux fois ( $m=1,91$ ) et celle de *LAMP2* augmente également légèrement ( $m=1,44$ ) (fig. 14).



### 3. Etude de l'expression génique et protéique de marqueurs lysosomaux et autophagiques dans des clones mutants pour la maspardine obtenus par la méthode CRISPR-Cas9

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons contribué à la caractérisation de clones dans lesquels l'expression du gène codant pour la maspardine a été inactivée par la méthode CRISPR-Cas9. Le gène a été inactivé par insertion et/ou délétion de bases dans son exon 2, en fonction des clones, conduisant ainsi à un décalage de son cadre de lecture.

Ces clones ont été produits par notre équipe comme une manière d'aborder l'étude de la fonction de la maspardine et, en particulier, afin de nous renseigner sur une éventuelle perturbation de la fonction des lysosomes et/ou de l'autophagie en absence d'expression du gène SPG21, puisque d'autres SPG, telles que SPG11 et SPG15, sont connues comme étant impliquées dans la reformation de lysosomes à partir des autophagolysosomes et que le trafic des récepteurs d'hydrolases acides est perturbé par une déficience en SPG48, SPG11, SPG15 et SPG8.

#### 3.1. Analyse de l'expression protéique de marqueurs du lysosome et de l'autophagie en absence de SPG21

Trois clones ont été sélectionnés parmi ceux produits par notre équipe : un clone contrôle et deux clones mutés pour la maspardine grâce à deux ARN guides différents (KO1 et KO2). Dans une première étape de l'étude de l'impact de l'absence d'expression de SPG21, nous avons analysé, par western blotting, l'expression protéique de marqueurs lysosomaux (LAMP1, LAMP2 et la cathepsine D), de marqueurs de l'autophagie (LC3-1/2 et p62) et de la maspardine elle-même dans les clones KO. p62 est une nucléoporine dégradée dans les autophagosomes après leur fusion avec les lysosomes (Rusten T.E. *et al.*, 2010). Il est important à noter que ces expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois.

Le tableau 3A est présenté de la même façon que le tableau 2B. Le rapport LC3-2/LC3-1 est supérieur à 1 pour le clone KO1 (rapport = 1,7) et pour le clone KO2 (rapport = 1,16) (tab. 3A et fig. 15A). La quantité totale des deux formes diminue quant à elle dans les deux KO. Le tableau 3B montre les valeurs normalisées par rapport au clone contrôle de la nucléoporine p62. Tandis que KO1 montre une expression protéique plus élevée de p62 que le contrôle (2,62), KO2 montre une expression plus faible (0,38) (tab. 3B et fig. 15B). Il est intéressant à noter que lors d'expériences plus récentes réalisées par l'équipe, ni le rapport LC3, ni la quantité des différentes formes de LC3, ni p62 ne présentent de différence significative dans les cellules KO. Ces observations suggèrent que l'absence de maspardine n'a pas d'impact sur l'autophagie dans les deux clones KO, du moins en conditions basales.

A	LC3-1 normalisé			
	LC3-1 normalisé	LC3-2 normalisé	LC3 total normalisé	Rapport LC3-1/LC3-2
Clone controle	1	1	1	1
KO1	0,46	0,26	0,34	1,73
KO2	0,55	0,47	0,5	1,16

B	signal brut p62	
	signal brut p62	signal normalisé p62
Clone controle	3.348.025.168	1
KO1	8.757.280.462	2,62
KO2	1.276.846.546	0,38

Tableau 3 : Expression des marqueurs d'autophagie LC3 et p62 dans des cellules HeLa (clones) contrôles ou KO pour SPG21. Des western blots ont été réalisés sur des lysats de cellules HeLa SPG21<sup>+/+</sup> ou SPG21<sup>-/-</sup> pour révéler le marqueur LC3 sous les deux formes LC3-I et LC3-II et le marqueur p62. A : quantités relatives de LC3-I, LC3-II et LC3 total dans les deux KOs normalisées par rapport à celles dans le clone contrôle et le rapport LC3-I/LC3-II. B : signaux bruts de la nucléoporine p62 dans chaque clone et valeurs dans les KOs normalisées par rapport au clone contrôle.



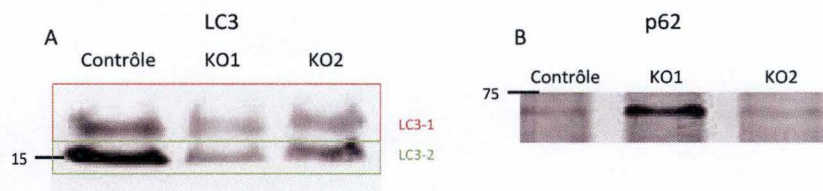


Figure 15 : Expression des marqueurs d'autophagie LC3 et p62 dans des cellules HeLa (clones) contrôles ou KO pour *SPG21*. Western blot révélant LC3-I et LC3-II (A) et p62 (B) dans les cellules contrôle, KO1 et KO2. Pour la partie A, l'encadré rouge correspond à la forme LC3-I et l'encadré vert à la forme LC3-II.

Dans la figure 16, les signaux visualisés par western blotting pour chaque marqueur ont été normalisés par rapport à l'expression de la GAPDH. Les valeurs normalisées obtenues pour KO1 et KO2 ont alors été rapportées aux valeurs mesurées dans le clone contrôle.

LAMP1 semble diminuer légèrement dans le KO1 (11% de moins par rapport au clone contrôle) et plus fortement dans le KO2 (34% de moins par rapport au clone contrôle). Dans cette expérience, l'expression de LAMP2 était inférieure à celle observée dans le contrôle alors que l'inverse était observé dans le clone KO2. A noter que ces observations n'ont pas été reproduites lors d'expériences qui furent réalisées dans des conditions optimales par l'équipe après mon stage. Il ne semble pas y avoir de différence reproductible et significative entre les cellules contrôles et les KO au niveau de l'expression totale de protéines membranaires LAMP1 et LAMP2. En ce qui concerne la cathepsine D, nous avons observé une très forte diminution de l'expression de sa forme précurseur et intermédiaire dans les KO (il ne reste que 4% et 8% du clone contrôle, respectivement). Le signal pour la forme mature était trop faible pour être détectable.

Enfin, nous avons détecté la maspardine qui représente un contrôle dans ces clones puisqu'ils sont mutés dans le gène codant pour cette protéine. L'expression protéique de la maspardine devrait donc, dans ce cas, être beaucoup plus faible que dans le clone contrôle. C'est ce qui peut être observé dans la fig. 16 où aucune bande correspondant à la maspardine ne semble distinguable du bruit de fond dans les clones KO. Il est important également à noter que la présence d'une mutation dans le gène *SPG21* et l'absence de signal protéique ont été validées par notre équipe. En effet, nous détectons moins de 0,1% de maspardine dans les clones KO.

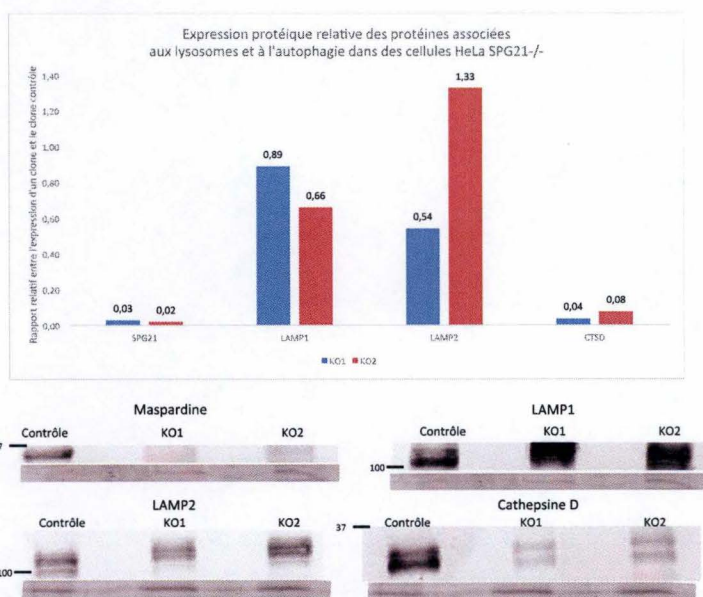


Figure 16 : Analyse de l'expression protéique de marqueurs du réseau CLEAR, de LAMP2 et de SPG21 entre un clone contrôle et des clones *SPG21*<sup>-/-</sup> par western blotting. Les expressions protéiques de la cathepsine D et de LAMP1 (deux éléments du réseau CLEAR) ainsi que de LAMP2/lysosomes et de la maspardine dans des clones dans lesquels le gène de la maspardine, *SPG21*, a été silencé ont été normalisées par rapport à celles d'un clone contrôle pour donner les rapports relatifs d'expression pour chaque clone dans le graphe. En dessous sont repris les western blots révélant chaque protéine avec le contrôle de charge GAPDH.



### 3.2. Analyse de l'expression de l'ARNm de marqueurs du lysosome et de l'autophagie en absence de SPG21

Nous avons décidé ensuite d'analyser l'expression génique des mêmes marqueurs, du facteur de transcription TFEB et de la maspardine dans KO1 et KO2 par une RT-qPCR.

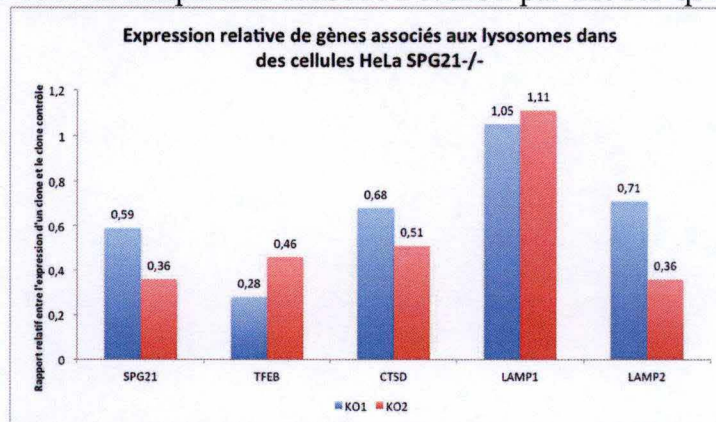


Figure 17 : Analyse de l'expression génique de marqueurs du réseau CLEAR, de LAMP2 et de SPG21 entre un clone contrôle et des clones SPG21<sup>-/-</sup> par RT-qPCR. Les expressions géniques de TFEB (facteur de transcription majeur du réseau CLEAR), de la cathepsine D et de LAMP1 (deux éléments du réseau CLEAR) ainsi que de LAMP2/lysosomes et de la maspardine dans des clones dans lesquels le gène de la maspardine, SPG21, a été silencé ont été normalisées par rapport à celles d'un clone contrôle pour donner les rapports relatifs d'expression pour chaque clone.

Dans la figure 17, les valeurs représentées sont normalisées par rapport à la valeur observée dans le clone contrôle.

Nous avons observé une diminution de l'expression génique de TFEB dans les deux clones KO1 et KO2 (0,28 et 0,46 respectivement). L'expression de LAMP2 semble également diminuer dans les cellules KO (0,71 et 0,36 respectivement), de même que l'expression de la cathepsine D (0,68 et 0,51 respectivement). Par contre, nous observons que l'expression de LAMP1 n'est pas modifiée dans les cellules KO (1,05 et 1,11 respectivement).

A noter que notre contrôle révèle une expression du gène codant pour la maspardine réduite dans les KO mais pas complètement abolie. Il semble que la présence de mutations dans l'exon 2 a diminué la stabilité de l'ARNm qui code pour cette protéine, mais que cela n'entraîne pas sa dégradation immédiate.



# Discussion



Une déficience de la maspardine cause la paraplégie spastique 21 (SPG21), ou syndrome de Mast. Cette pathologie présente une atteinte des neurones moteurs corticospinaux, ce qui mène à une spasticité progressive (Noreau A. *et al.*, 2014 ; Lo Giudice T. *et al.*, 2014 ; Hensiek A. *et al.*, 2015). Des observations réalisées lors d'une étude antérieure ont mis en évidence que cette protéine se localise en partie au niveau des lysosomes et en partie au niveau du cytosol dans les cellules du foie de rat (Jadot M. *et al.*, 2017). A ce jour, la fonction de la maspardine n'a cependant pas été élucidée. Afin de contribuer à l'identification de cette fonction, nous avons tout d'abord analysé la localisation subcellulaire de la maspardine dans une lignée de cellules neuronales (SK-N-BE), afin d'avoir un modèle cellulaire proche du type cellulaire impacté dans le syndrome de Mast. Cette étude a nécessité d'établir préalablement les profils de distribution des organites intracellulaires, dont les lysosomes, après fractionnement de ces cellules par diverses méthodes. Nos résultats indiquent que la technique de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle mise au point par C. de Duve (de Duve C. *et al.*, 1955) permet de générer des profils de distribution distincts pour les lysosomes, les mitochondries, le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique, les peroxysomes et le cytosol lorsqu'on l'applique de manière légèrement adaptée, aux cellules SK-N-BE. Les lysosomes et les mitochondries, en particulier, présentent un enrichissement dans la fraction L. VPS26, une protéine connue comme ayant, elle aussi, une « double localisation » (endosome et cytosol), un enrichissement dans les fractions P et S. La maspardine, notre protéine d'intérêt, est principalement retrouvée dans les fractions L, P et S dans les cellules SK-N-BE. Au vu des résultats obtenus pour les marqueurs des compartiments subcellulaires, et les données de localisation obtenues dans le foie de rat, il est probable que cette distribution puisse représenter une localisation double cytosolique-endolysosomale. En accord avec cette interprétation, les résultats du fractionnement sur gradient de densité de Percoll suggèrent qu'une partie de la population de la maspardine se localise au niveau des lysosomes.

Il est intéressant de noter que la fraction de maspardine associée aux lysosomes dans les cellules SK-N-BE est au moins deux fois moindre que celle observée dans le foie de rat d'après les résultats antérieurs publiés (Jadot M. *et al.*, 2017). Ceci pourrait être expliqué par les nombreuses différences physiologiques entre les hépatocytes et les neurones, qui touchent entre autre le système endolysosomal et les processus associés à ce système.

Le système de transport qui voit transiter le plus de protéines dans les deux types cellulaires est notamment distinct. En effet, le processus de transcytose est très actif dans les hépatocytes tandis que le trafic vésiculaire passant par le réseau trans-Golgien (TGN) est très développé dans les neurones (Horton A. C. *et al.*, 2003). Notons aussi que ces deux types cellulaires ne dépendent pas de la même façon des systèmes sécrétoire et endocytaire (Horton A. C. *et al.*, 2003). Par exemple, l'endocytose est un processus prédominant dans les hépatocytes et dans les neurones, mais ce processus joue un rôle supplémentaire dans les neurones au niveau du recyclage des vésicules synaptiques (Bellettato C. M. *et al.*, 2010). Il ne serait donc pas inattendu que la composition des vésicules de transport et des compartiments de la voie endolysosomale diffèrent légèrement selon les types cellulaires. Le protéome lysosomal lui-même n'est pas identique dans tous les tissus. L'abondance relative de certaines protéines est variable dans les lysosomes qui proviennent de types cellulaires différents (Stavoe A. K.-H. *et al.*, 2018). Notons à titre d'exemple que la phosphatase acide ACP5 est exprimée par les hépatocytes mais pas par les neurones (Sun P. *et al.*, 2008).

Il est aussi intéressant de remarquer que le déroulement de l'autophagie diffère lui aussi d'un type cellulaire à un autre, or plusieurs protéines qui sont mutées dans des paraplégies spastiques jouent un rôle dans ce processus. D'après Mizushima *et al.*, le marqueur des



autophagosomes LC3-1 est bien plus exprimé à l'état basal dans le cerveau que dans le foie (Mizushima N. *et al.*, 2004). Dans les hépatocytes, la mitophagie semble plus active (Madrigal-Matute J. *et al.*, 2016) tandis que dans les neurones, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes dépendante de LAMP2 (Ward C. *et al.*, 2016 ; Erbil-Bilir S. *et al.*, 2017 ; Menzies F. M. *et al.*, 2017 ; Jiang P. *et al.*, 2013 ; Seranova E. *et al.*, 2017) apparaît comme un processus de dégradation central, que ce soit en conditions de privation de nutriments ou en situation normale afin de maintenir l'équilibre homéostatique (Erbil-Bilir S. *et al.*, 2017 ; Stavoe A. K.-H. *et al.*, 2018). Les protéines SPG qui ont été démontrées comme étant impliquées dans le déroulement de la macroautophagie le sont principalement au niveau de la reformation de lysosomes à partir d'autophagolysosomes. Si la maspardine est impliquée dans un processus similaire, sa présence relative sur les lysosomes pourrait différer en fonction du degré d'autophagie basale existant dans le type cellulaire concerné.

Enfin, la régulation de l'expression génique est différente dans tous les types cellulaires. L'équipe du professeur Weng (Weng M. K. *et al.*, 2014) a démontré que sur 156 gènes impliqués dans la fonction lysosomale dont l'expression a été observée dans les hépatocytes et les neurones, 14 (9%) étaient régulés de manière opposée et 69 (45%) étaient régulés de la même façon. Notons enfin que les hydrolases lysosomales peuvent présenter également des modifications post-traductionnelles propres au type cellulaire (Annunziata I. *et al.*, 2018).

Toutes ces références indiquent qu'il faut être prudent lorsqu'il s'agit de comparer de manière fine les localisations subcellulaires de protéines dans deux types cellulaires aussi distincts que des hépatocytes et des neurones, en particulier lorsque les protéines d'intérêt présentent une « double localisation » (ici lysosome-cytosol). Enfin, s'agissant de comparer nos distributions à celles obtenues dans le foie de rat, il faudra ne pas perdre de vue la complexité supplémentaire résultant de l'hétérogénéité cellulaire caractérisant ce tissu.

Il a déjà été décrit dans la littérature que la maspardine interagissait avec le marqueur des endosomes tardifs Rab7 (McCray B. A. *et al.*, 2010). Rab7 est une petite GTPase qui joue plusieurs rôles dans le trafic vésiculaire, dont la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs, la migration des endosomes le long des microtubules ou encore le transport endosomes-lysosomes en permettant diverses interactions protéine-protéine (Wang T. *et al.*, 2011). En plus de ces fonctions en conditions basales, Rab7 joue également un rôle dans le recrutement de la dynéine sur les autophagosomes pour permettre leur déplacement et in fine, leur fusion avec les lysosomes lors de la macroautophagie (Stavoe A. K.-H. *et al.*, 2018 ; Ward C. *et al.*, 2016 ; Kuech E.-M. *et al.*, 2016 ; Schroeder B. *et al.*, 2015 ; Schulze R. J. *et al.*, 2017).

D'autre part, rappelons que d'autres protéines mutées dans des paraplégies spastiques héréditaires sont impliquées dans le trafic endolysosomal et vésiculaire. SPG11, SPG15 et AP5 jouent toutes trois des rôles durant l'autophagie déclenchée par un stress de privation de nutriments. Ces trois protéines sont impliquées dans la reformation de lysosomes à partir d'autophagosomes, et la perte de l'une seule d'entre elles provoque l'accumulation d'autophagosomes élargis et de structure anormale (Renvoisé B. *et al.*, 2014 ; Hirst J. *et al.*, 2015 ; Hirst J. *et al.*, 2018). En effet, ces trois protéines contrôlèrent le bourgeonnement de tubules/vésicules à partir des autophagolysosomes. Ces tubules/vésicules maturaient ensuite en de nouveaux lysosomes (Renvoisé B. *et al.*, 2014). Plus récemment, il a aussi été démontré qu'un mécanisme de trafic vésiculaire rétrograde, prenant place au départ des endosomes tardifs et du réseau trans-Golgien était dépendant du complexe formé par SPG11, SPG15 et AP5 (Hirst J. *et al.*, 2018). LYST, une protéine également mutée aussi dans une paraplégie spastique, exercerait quant à elle un rôle dans la fission et la fusion vésiculaires (Shimazaki H. *et al.*, 2014). Ces observations sont à l'origine de notre hypothèse de travail : la maspardine



serait-elle, elle aussi, impliquée dans un mécanisme de transport vésiculaire à partir du, ou dirigé vers, le système endolysosomal ?

Dans la seconde partie de ce mémoire, nous avons voulu tester l'hypothèse d'une association de la maspardine observée dans la fraction S, à des petites vésicules qui deviendraient sédimentables dans un champ centrifuge de valeur plus importante que celui utilisé pour sédimenter la fraction P, ce qui plaiderait en faveur de notre hypothèse de travail. Nos résultats montrent que 15% de la population de la maspardine qui se trouve dans la fraction S sont sédimentés à haute vitesse. Ceci suggère que cette fraction de la maspardine est soit associée à de petites vésicules membranaires, soit à des agrégats protéiques sédimentables dans les conditions de centrifugation utilisées.

Un trafic vésiculaire dépendant de la maspardine dans le système endolysosomal pourrait être plus ou moins actif dans différentes conditions expérimentales de nature à perturber la fonction des lysosomes et/ou à modifier le déroulement du processus autophagique. Il est connu que l'accumulation de matériel non dégradé dans les lysosomes perturbe les processus de fusion des lysosomes avec d'autres compartiments membranaires (Samarani M. *et al.*, 2018 ; Parenti G. *et al.*, 2015). Le trafic vésiculaire à partir d'endosomes tardifs se trouve notamment impacté (Bellettato C. M. *et al.*, 2010). La mise en place de l'autophagie est, elle aussi, perturbée en raison des problèmes de fusion, et en raison de la perturbation des réactions d'hydrolyses lysosomales dans un milieu lysosomal renfermant un excès de matériel non dégradé et/ou accumulé (Lieberman A. P. *et al.*, 2012 ; Bellettato C. M. *et al.*, 2010). Dans le cadre de nos recherches, nous avons testé si une accumulation de matériel dans les lysosomes ou encore une induction plus directe de l'autophagie (par une privation de nutriments) pourrait se traduire par un changement de la taille de la population de la maspardine associée aux membranes endolysosomales/autophagolysosomales. Notons que MTORC1, une protéine importante située, lorsqu'elle est activée, à la surface externe de la membrane des lysosomes, subit des changements de localisation lors de surcharges lysosomales et en réponse au jeûne (Madrigal-Matute J. *et al.*, 2016 ; Menzies F. M. *et al.*, 2017 ; Seranova E. *et al.*, 2017 ; Bellettato C. M. *et al.*, 2010). C'est également le cas de protéines déficientes dans certaines paraplégies spastiques comme SPG11, SPG15 ou SPG48 (Hirst J. *et al.*, 2018). Il est également intéressant de noter que d'autres équipes ont aussi analysé les impacts du jeûne ou de surcharges lysosomales, notamment par exposition au saccharose (Higuchi T. *et al.*, 2015), dans les cellules HeLa (Wei Y. *et al.*, 2008 ; Wu C.-A. *et al.*, 2014 ; Medina D. L. *et al.*, 2015 ; Palmieri M. *et al.*, 2011 ; Settembre C. *et al.*, 2015 ; Sardiello M. *et al.*, 2009 ; Hirst J. *et al.*, 2018).

Pour réaliser ces tests fonctionnels, nous avons dû mettre au point ce que nous avons appelé un fractionnement « en eppendorfs » (c'est-à-dire une adaptation en très petits volumes du fractionnement classique évoqué ci-dessus) des cellules HeLa, cellules qui sont utilisées par de nombreuses équipes pour étudier des processus de transport vésiculaire (Wei Y. *et al.*, 2008 ; Wu C.-A. *et al.*, 2014 ; Medina D. L. *et al.*, 2015 ; Vantaggiato C. *et al.*, 2013 ; Palmieri M. *et al.*, 2011 ; Settembre C. *et al.*, 2015 ; Sardiello M. *et al.*, 2009 ; Hirst J. *et al.*, 2018).

Les résultats de nos tests fonctionnels ont montré qu'après un traitement au saccharose pendant 48h, l'intensité spécifique relative (enrichissement) et le pourcentage de la maspardine pourraient laisser penser à une légère augmentation dans la fraction MLP, fraction qui contient les organites membranaires excepté le noyau, au détriment de la fraction S, qui contient les protéines cytosoliques solubles, mais ces diminutions observées dans la fraction S ne revêtent pas un caractère significatif.



Les augmentations du pourcentage et de l'intensité spécifique relative de la maspardine observées dans la fraction MLP pourraient être dues à un emprisonnement d'une partie de la population cytosolique de la protéine dans des autophagosomes qui sont sédimentés dans cette fraction MLP. Cependant, si cela était le cas, nous aurions aussi observé une augmentation dans la fraction MLP du pourcentage d'activité et de l'activité spécifique relative de la DPPIII, notre marqueur cytosolique, ce qui n'est pas le cas après un traitement de 48h avec du saccharose. La conclusion la plus logique nous semble être qu'une petite partie de la population de maspardine est recrutée sur les endolysosomes en condition de surcharge lysosomale. Une hypothèse pour expliquer ce recrutement est que la maspardine pourrait participer à un processus de transport de matériel au départ des lysosomes surchargés dans un mécanisme de « réponse » permettant une décharge de l'organite. Une autre possibilité pourrait être que la surcharge, et le gonflement des endolysosomes qui s'en suit, perturbe la dissociation de la maspardine de son site de liaison à la surface de ces organites. D'autres équipes ont d'ailleurs prouvé que les surcharges lysosomales pouvaient être à l'origine de changement de localisation de certaines protéines car cette condition perturbe le trafic intracellulaire (Lieberman A. P. *et al.*, 2012 ; Bellettato C. M. *et al.*, 2010). Il a déjà été observé également que le complexe rétromère, par exemple, est recruté lors d'une surcharge lysosomale afin de transporter du matériel accumulé hors des lysosomes (McMillan K. J. *et al.*, 2017).

Lors d'une privation de nutriments provoquée par un remplacement du milieu de croissance cellulaire riche en nutriments par de l'HBSS durant 4h, le pourcentage de la maspardine diminue dans la fraction MLP. L'intensité spécifique relative de la maspardine semble, quant à elle, augmenter dans la fraction S. Ces résultats suggèrent que la maspardine se détache en partie des endolysosomes, et éventuellement des autophagolysosomes, lors d'une période de jeûne. Une diminution de présence dans la fraction MLP est aussi observée pour la  $\beta$ -galactosidase et pour LAMP2, mais ces diminutions sont accompagnées d'une délocalisation vers la fraction N (nucléaire) et non la fraction S. Une possibilité serait que de gros autophagolysosomes aient sédimenté dans la fraction N. A noter que ce « déplacement » s'accompagne d'une augmentation du pourcentage de protéines totales dans la fraction N après traitement.

D'autres protéines impliquées dans la régulation de la fonction lysosomale subissent des changements de localisation lors d'une période de jeûne (Erbil-Bilir S. *et al.*, 2017). L'exemple le mieux documenté concerne MTORC1, un complexe doté d'une activité ser/thr kinase, qui empêche l'induction de l'autophagie en conditions normales. En conditions de stress et en particulier de privation en certains acides aminés, MTORC1 est inactif et délocalisé de la membrane lysosomale vers le cytosol. Ce changement s'accompagne d'une perte de l'activité kinase, ce qui va autoriser la mise en route de la macroautophagie (Madrigal-Matute J. *et al.*, 2016 ; Menzies F. M. *et al.*, 2017 ; Seranova E. *et al.*, 2017 ; Settembre C. *et al.*, 2015 ; Jung C. H. *et al.*, 2010). D'autres protéines que le complexe MTORC1, impliquées dans le processus autophagique, subissent également des changements de localisation lors de l'autophagie. Par exemple, lorsqu'il n'y a plus de nutriments et que du coup MTORC1 est inhibé, il ne peut plus phosphoryler ULK1. Ce dernier va alors être activé et recruté du cytosol vers les compartiments membranaires (Erbil-Bilir S. *et al.*, 2017 ; Hurley J. H. *et al.*, 2016 ; Seranova E. *et al.*, 2017 ; Jung C. H. *et al.*, 2010). ULK1 joue alors un rôle dans le recrutement des protéines nécessaires à l'autophagie sur les autophagosomes et lysosomes, comme Atg13 qui se déplace aussi du cytosol vers ces compartiments (Jung C. H. *et al.*, 2010).



Nos résultats pourraient signifier que la maspardine se détache des lysosomes, des endosomes et/ou des autophagolysosomes pendant l'autophagie. Une hypothèse serait que la condition de jeûne provoque un changement dans la composition membranaire des organites auxquels la maspardine est associée. Il a déjà été décrit dans la littérature que les changements de composition membranaire pouvaient provoquer des répercussions importantes sur le trafic intracellulaire. Un changement dans la quantité de cholestérol membranaire peut, par exemple, modifier le trafic vésiculaire (Kuech E.-M. *et al.*, 2016). Un autre exemple concerne les glycosphingolipides pouvant être impliqués dans une perturbation du trafic de la protéine DPPIV (dipeptidyl-aminopeptidase IV) entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique, qui est observée dans la pathologie de Fabry (Kuech E.-M. *et al.*, 2016). Une modification de la concentration en ganglioside GM1 peut provoquer des altérations de la localisation de certaines protéines et lipides associés à la membrane plasmique, au réticulum endoplasmique et aux lysosomes (Annunziata I. *et al.*, 2018). Or, les organites membranaires sont en constante communication les uns avec les autres. Un changement de composition membranaire au niveau du réticulum endoplasmique, par exemple, aura des répercussions sur celle d'autres organites (Annunziata I. *et al.*, 2018). De plus, les membranes des autophagosomes proviennent, au moins en partie, des endosomes de recyclage. Il se peut qu'en cas de perturbation du trafic endolysosomal, lors de l'autophagie par exemple, la composition membranaire de ces endosomes de recyclage soit modifiée et que cela ait des répercussions sur la composition membranaire des autophagosomes (Menzies F. M. *et al.*, 2017). Il a également été prouvé qu'un changement dans la composition membranaire des autophagosomes pouvait empêcher leur fusion avec les lysosomes et perturber le recyclage de leur contenu (Madrigal-Matute J. *et al.*, 2016).

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer le détachement membranaire de la maspardine en conditions de jeûne serait sa présence éventuelle dans une plateforme de signalisation localisée à la surface des endosomes ou lysosomes, telle que MTORC1 dont nous avons parlé. Comme mentionné plus haut, MTORC1 est impliqué dans la voie TFEB. L'expression de nombreuses protéines impliquées dans la fonction lysosomale et dans l'autophagie est régulée par le facteur de transcription majeur TFEB. Ce facteur de transcription joue un rôle dans de nombreux processus liés à la fonction lysosomale tels que la biogenèse des lysosomes et des autophagosomes, et la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique (Lieberman A. P. *et al.*, 2012 ; Hurley J. H. *et al.*, 2016 ; Palmieri M. *et al.*, 2011 ; Settembre C. *et al.*, 2012 ; Seranova E. *et al.*, 2017 ; Napolitano G. *et al.*, 2016).

TFEB est inhibé lorsqu'il est en contact avec, et de ce fait phosphorylé par, le complexe MTORC1. Dans sa forme non-phosphorylée uniquement, TFEB peut être délocalisé vers le nucléoplasme et exercer son activité transcriptionnelle contribuant à l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans la fonction lysosomale (Palmieri M. *et al.*, 2011 ; Settembre C. *et al.*, 2015 ; Settembre C. *et al.*, 2012 ; Napolitano G. *et al.*, 2016). Les gènes régulés par TFEB possèdent une séquence palindromique particulière d'une dizaine de bases qui est reconnue par ce facteur de transcription. Cette séquence a été nommée « CLEAR » (Coordinated Lysosomal Expression And Regulation) et le réseau de gènes cibles a repris également ce nom. Plus de 470 gènes faisant partie du réseau CLEAR ont été identifiés, parmi lesquelles nous retrouvons des hydrolases acides et des protéines membranaire endolysosomales comme Rab7 par exemple (Palmieri M. *et al.*, 2011 ; Settembre C. *et al.*, 2015 ; Napolitano G. *et al.*, 2016 ; Settembre C. *et al.*, 2012 ; Parenti G. *et al.*, 2015).

D'autres équipes ont utilisé une exposition à l'HBSS dans l'étude de l'autophagie (Schroeder B. *et al.*, 2015 ; Wu C.-A. *et al.*, 2014 ; Wei Y. *et al.*, 2008) mais certaines méthodes alternatives d'induction de l'autophagie pourraient aussi être utilisées ultérieurement pour valider nos observations. Parmi celles-ci, la rapamycine, une molécule exerçant un effet



inhibiteur sur le complexe MTORC1 (Ward C. *et al.*, 2016 ; Ballou L.M. *et al.*, 2008), le retrait de l'insuline dans le milieu de culture, ce qui active l'autophagie d'une façon dépendante de MTORC1 (Young J. E. *et al.*, 2008) ou encore la thapsigargine qui inhibe directement MTORC1 (Medina D. L. *et al.*, 2015). Une autre équipe a également utilisé un équivalent de l'HBSS, l'EBSS, en tant qu'inducteur de l'autophagie (Settembre C. *et al.*, 2015).

Il est également intéressant de noter que l'induction de l'autophagie a été évaluée en mesurant le rapport d'intensité des marqueurs LC3-1 et LC3-2 (forme conjuguée lors de l'autophagie). Cette technique, dont les résultats devront être analysés avec prudence, a été utilisée dans de très nombreux travaux portant sur l'autophagie (Ward C. *et al.*, 2016 ; Seranova E. *et al.*, 2017) mais la plupart utilisent des inhibiteurs de protéases comme la bafilomycine lors de ces tests (Erbil-Bilir S. *et al.*, 2017 ; Wu C.-A. *et al.*, 2014 ; Vantaggiato C. *et al.*, 2013 ; Oz-Levi D. *et al.*, 2012). En effet, LC3-2 étant dégradé par les protéases présentes dans les autophagolysosomes, ce qui peut fausser le résultat, il est intéressant d'utiliser la bafilomycine en tant qu'agent bloquant l'acidification des lysosomes et donc l'activité des enzymes lysosomales. Une autre équipe a également normalisé le rapport LC3-1/LC3-2 en utilisant l'expression de l'actine comme contrôle de charge (Schulze R. J. *et al.*, 2017).

Le fait de voir un effet opposé au niveau de la redistribution de la maspandine en condition de surcharge lysosomale et de jeûne pourrait être assez logique si l'on considère que les surcharges lysosomales peuvent être aussi à l'origine d'un changement de composition membranaire des organites (Samarani M. *et al.*, 2018) et que ces changements peuvent conduire à l'inhibition de l'autophagie (Bellettato C. M. *et al.*, 2010 ; Seranova E. *et al.*, 2017 ; Jiang P. *et al.*, 2013 ; Parenti G. *et al.*, 2015), tandis qu'une période de jeûne stimule l'autophagie (Erbil-Bilir S. *et al.*, 2017).

Comme déjà mentionné plus haut, le facteur TFEB régule l'expression de gènes possédant une séquence « CLEAR » dans leur région promotrice. L'équipe du professeur Sardiello (Sardiello M. *et al.*, 2009) a remarqué que le gène *SPG21* codant pour la maspandine possède une séquence « CLEAR » dans sa région promoteur, suggérant qu'il pourrait être exprimé différemment en cas d'activation ou d'inactivation de TFEB. Notons que le gène codant pour TFEB fait lui-même partie du réseau de gènes avec un élément « CLEAR » (Sardiello M. *et al.*, 2009), ce qui permet la mise en place d'une boucle d'auto-amplification en conditions de jeûne par exemple. Toutes ces informations nous ont conduit à investiguer si les expressions de TFEB, de certains gènes régulés par ce facteur de transcription (*LAMP1* et cathepsine D) et de *SPG21* changeaient dans les conditions que nous avons utilisées pour induire une surcharge lysosomale ou de l'autophagie. Nous avons également investigué les répercussions d'un traitement par la torine, une molécule qui entre en compétition avec le complexe MTORC1 pour sa liaison à l'ATP et qui est donc un inhibiteur de celui-ci, ceci conduisant à un processus d'autophagie via l'activation de TFEB (Thoreen C. *et al.*, 2009). Nos résultats montrent une légère augmentation d'expression pour *LAMP1* et *SPG21* mais, à ce stade, nous ne pouvons pas être sûrs que cette différence soit dépendante de TFEB ou non. Une explication pourrait être que les temps d'incubation choisis (48h pour le saccharose et 2h pour le jeûne) ne soient pas compatibles avec l'observation de changements d'expression qui pourraient se manifester de façon précoce au niveau de leurs ARNm. Notons toutefois que d'autres équipes ont déjà observé des changements d'expression de *TFEB* et *LAMP1* lors d'un traitement à la torine dans des conditions similaires à celles que nous avons utilisées, mais dans d'autres types cellulaires (Medina D. L. *et al.*, 2015 ; Settembre C. *et al.*, 2015). Des expériences supplémentaires semblent dès lors requises pour tirer cela au clair et déterminer si



nos conditions expérimentales sont adéquates et si les cellules HeLa peuvent répondre de façon « attendue » à une induction de l'autophagie par les méthodes que nous avons choisies.

La modification la plus marquée que nous avons observée concerne la cathepsine D. A ce stade, nous ne savons pas si cette observation traduit une réalité biologique car cette expérience n'a pas pu être répétée durant mon séjour au laboratoire. L'expression de la cathepsine D semble être inhibée dans certaines pathologies présentant une surcharge des lysosomes, telles que la lipofuscinose neuronale cérébrale ou la maladie de Gaucher (Ward C. *et al.*, 2016) mais une autre équipe a observé une augmentation de cette expression lors de l'induction d'une surcharge lysosomale lipidique dans les neurones (Amritraj A. *et al.*, 2012).

Le dernier aspect de la caractérisation fonctionnelle de la maspardine que nous avons voulu aborder est l'impact que pourrait avoir une inhibition de l'expression de *SPG21* sur l'expression de diverses protéines lysosomales et de TFEB. L'équipe a décidé pour ce faire de produire, à l'aide de la technique CRISPR-cas9, des cellules clonales mutées pour le gène *SPG21*. L'obtention et la caractérisation de clones CRISPR sont un travail conséquent qui comprend de multiples étapes. Dans le cadre de ce mémoire, j'ai participé à cette caractérisation en recherchant d'éventuelles modifications d'expression génique et protéique de divers marqueurs. La logique sous-tendant cet effort que si l'absence de maspardine provoque une perturbation du trafic vésiculaire au niveau endolysosomal, il est possible que la composition et les fonctions des lysosomes en soient altérées.

Il est décrit dans la littérature que des cellules déficientes pour *SPG11* et *SPG15* montrent une diminution du nombre de lysosomes et une augmentation du nombre d'autophagosomes (Menzies F. M. *et al.*, 2017 ; Renvoisé B. *et al.*, 2014 ; Vantaggiato C. *et al.*, 2013 ; Shimazaki H. *et al.*, 2014). Cela est accompagné par une augmentation de l'expression de *LAMP1* (Hirst J. *et al.*, 2015 ; Hirst J. *et al.*, 2018 ; Renvoisé B. *et al.*, 2014). Un mutant de *AP5* empêche la formation du complexe *AP5-SPG11-SPG15* et a, de ce fait, le même phénotype qu'un mutant de ces deux gènes en plus de perturber le trafic vésiculaire (Renvoisé B. *et al.*, 2014 ; Hirst J. *et al.*, 2015). Un mutant de *SPG49* provoque une diminution de la formation d'autophagosomes et une diminution de l'expression de *LC3* (Menzies F. M. *et al.*, 2017 ; Oz-Levi D. *et al.*, 2012 ; Shimazaki H. *et al.*, 2014). Enfin, un mutant de *SPG20* perturbe le trafic endosomal (Oz-Levi D. *et al.*, 2012), un mutant de *SPG4* va conduire à la formation de lysosomes aberrants (Hirst J. *et al.*, 2018) et un mutant de *LYST* va provoquer l'apparition de larges granules dans les cellules natural killers (Shimazaki H. *et al.*, 2014). De plus, il a été décrit qu'un mutant d'un gène codant pour une protéine impliquée dans l'autophagie pouvait conduire à des problèmes synaptiques des neurones moteurs (Stavoe A. K.-H. *et al.*, 2018). Il n'est donc pas rare de voir des changements au niveau du déroulement de l'autophagie ou une perturbation de l'expression des protéines lysosomales membranaires en cas de mutation d'un gène impliqué dans une paraplégie spastique. Ces observations nous ont conforté dans notre souhait de tester l'impact d'une répression de *SPG21* sur l'expression protéique et génique de marqueurs des lysosomes et de l'autophagie.

De plus, vu que ces changements d'expression pourraient, par exemple, être liés à l'activation du réseau CLEAR, nous voulions observer si l'expression des gènes de ce réseau et/ou l'expression protéique de certains gènes cibles étaient différentes dans un mutant *SPG21*.

Nos résultats montrent que la maspardine et son ARNm peuvent encore être détectés dans les clones mutés. Il est important de noter que lors d'expériences réalisées par l'équipe après mon séjour dans le laboratoire, la maspardine n'a plus jamais été détectée dans les cellules KO par « western blotting ». Les résultats concernant l'ARNm peuvent être, quant à eux, expliqués par le fait que la mutation ait provoqué l'apparition d'un codon STOP prématuré dans le transcrit. Un ARNm avec un codon STOP prématuré peut être dégradé de deux façons



différentes : soit par le complexe UPF1/2/3 dans le noyau, soit par détection d'une jonction exon-exon par un complexe multiprotéique au niveau des ribosomes (Nickless A. *et al.*, 2017 ; Metze S. *et al.*, 2013). Dans ce deuxième modèle, l'ARNm n'est pas immédiatement dégradé et subsiste un temps dans le cytosol. Il est possible que le taux d'ARNm codant pour la maspardine qui a été détecté dans nos clones SPG21-/- soit donc lié à des versions tronquées de cet ARNm non encore dégradées.

Pour les marqueurs des lysosomes et de l'autophagie, de légères différences au niveau de l'expression protéique de certains d'entre eux (LAMP1, LC3 et cathepsine D totale) ont été observées. Cependant, depuis la fin de mon stage, ces résultats n'ont pas pu être reproduits par l'équipe. Une certaine variabilité est rencontrée d'une expérience à l'autre mais le bilan indique qu'il n'y a pas de modification significative de la quantité de protéines lysosomales ni des marqueurs de l'autophagie dans les cellules KO par rapport aux cellules contrôles. Nous n'avons pas non plus remarqué une vacuolisation des ces cellules, ce qui nous laisse penser que la déficience en *SPG21* ne cause pas de surcharge lysosomale.

Au niveau des ARNm, la différence la plus marquée et reproductible est celle concernant le gène codant pour TFEB. Le gène *TFEB* fait lui-même partie du réseau CLEAR, c'est-à-dire que son expression est régulée par la translocation de son produit protéique TFEB vers le noyau. Comme nous l'avons vu, cette translocation est notamment dépendante de l'état de phosphorylation des différents sites de phosphorylation du facteur de transcription, une phosphorylation principalement dépendante de MTORC1. Un « screening » récent des phosphatases de TFEB a montré que l'inhibition de certaines d'entre elles, telle que la calcineurine par exemple, empêchait la translocation nucléaire de TFEB, inhibant par conséquent l'expression des gènes du réseau CLEAR et surtout celle de *TFEB*. De plus, les auteurs de ce « screening » ont démontré que l'inhibition de la calcineurine pouvait être la conséquence d'une déficience de MCOLN1, une protéine membranaire lysosomale permettant un flux de calcium lysosomal (Puertollano R. *et al.*, 2018). Une hypothèse pouvant expliquer nos résultats serait donc que la maspardine joue un rôle dans l'activation d'une ou plusieurs phosphatase(s) de TFEB peut-être par interaction protéine-protéine. Si *SPG21* est silencé, cela provoquerait alors une altération de l'activation de ces phosphatases, ce qui au final empêcherait la translocation de TFEB vers le noyau. Il en résulterait une diminution de l'expression de *TFEB*.

En conclusion, même s'il n'y a pas de modification majeure de l'expression protéique et génique des marqueurs analysés en conditions basales, la diminution de TFEB au niveau ARNm, qui devra être confirmée au niveau protéique, suggère que les cellules KO pourraient répondre différemment à des stimuli qui activent la voie TFEB.



# Bibliographie



- Amritraj A., Wang Y., Revett T. J., Vergote D., Westaway D. and Kar S. (2013), **Role of Cathepsin Din U18666A-induced Neuronal Cell Death**, *The Journal of Biological Chemistry* 288/5, 3136-3152.
- Annunziata I., Sano R. and d'Azzo A. (2018), **Mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and lysosomal storage diseases**, *Journal of the Cell Death Differentiation Association* 9, 328-344
- Bahr B. A. and Bendiske J. (2002), **The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction**, *Journal of Neurochemistry* 83, 481-489.
- Ballou L. M. and Lin R. Z. (2008), **Rapamycin and mTOR kinase inhibitors**, *Journal of Chemical Biology* 1, 27-36.
- Bawoska J.C., Jupille H., Fatheddin P., Puertollano R. and Blackstone C. (2007), **Troyer Syndrome protein Spartin is mono- ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking**, *Molecular Biology of the Cell* 18, 1683-1692.
- Bellettato C. M. and Scarpa M. (2010), **Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders**, *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33/4, 347-362.
- Bi X. and Liao G. (2010), **Cholesterol in Niemann-Pick Type C disease**, *Subcellular Biochemistry* 51, 319-335.
- Blackstone C., O'Kane C. J. and Reid E. (2010), **Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway**, *Neuroscience* 12, 31-42.
- Bonifacino J. S. and Hurley J. H. (2008), **Retromer**, *Current Opinion in Cell Biology* 20/4, 427-436.
- Bonifacino J. S. (2014), **Adaptor proteins involved in polarized sorting**, *Journal of Cell Biology* 204/1, 7-17.
- Boonen M., Hamer I., Boussac M., Delsaute A.- F., Flamion B., Garin J. and Jadot M. (2016), **Intracellular localization of p40, a protein identified in a preparation of lysosomal membranes**, *Biochemical Journal* 395, 39-47.
- Branchu J., Boutry M., Sourd L., Depp M., Leone C., Corriger A., Vallucci M., Esteves T., Matusiak R., Dumont M., Muriel M.-P., Santorelli F., Brice A., El Hachimi K., Stevanin G. and Darios F. (2017), **Loss of spatacsin function alters lysosomal lipid clearance leading to upper and lower motor neuron degeneration**, *Neurobiology of Disease* 102, 21-37.
- Buschow S. I., Nolte-'t Hoen E. N. M., Van Niel G., Pols M. S., Broeke T. T., Lauwen M., Ossendorp F., Melief C. J. M., Raposo G., Wubbolts R., Wauben M. H. M. and Stoorvogel W. (2009), **MHC II in Dendritic Cells is Targeted to Lysosomes or T Cell-Induced Exosomes Via Distinct Multivesicular Body Pathways**, *Traffic* 10/10, 1528-1542.



- Castro-Gomes T., Corrotte M., Tam C. and Andrews N. W. (2016), **Plasma Membrane Repair Is Regulated Extracellularly by Proteases Released from Lysosomes**, PLoS ONE 11/3, 1-26.
- Chertemps T., Montagné N., Bozzolan F., Maria A., Durand N. and Maïbèche-Coisne M. (2012), **Characterization of Maspardin, responsible for human Mast syndrome, in an insect species and analysis of its evolution in metazoans**, Naturwissenschaften 99, 537-543.
- Chevalier-Larsen E. and Holzbaur EL. (2006), **Axonal transport and neurodegenerative disease**, Biochim Biophys Acta (BBA) 1762, 1094-1108.
- Choquet D. and Triller A. (2013), **The dynamic synapse**, Neuron 80/3, 691-703.
- Coutinho M. F., Prata M. J. and Alves S. (2012), **Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction**, Molecular Genetics and Metabolism 105, 542-550.
- Crosby A. and Proukakis C. (2002), **Is the transportation highway the right road for Hereditary Spastic Paraplegia?**, American Society of Human Genetics 71, 1009-1016.
- de Duve C., Pressman B.C., Gianetto R., Wattiaux R. and Appelmans F. (1955), **Intracellular distribution patterns of enzymes in Rat-Liver tissue**, Biochem journal 60, 604- 617.
- Derivery E., Sousa C., Gautier J. J., Lombard B., Loew D. and Gautreau A. (2009), **The Arp2/3 Activator WASH Controls the Fission of Endosomes through a Large Multiprotein Complex**, Developmental Cell 17, 712-723.
- Duman J. G. and Forte J. G. (2003), **What is the role of SNARE proteins in membrane fusion?**, American Physiological Society 285, 237-249.
- Emes R. D. and Grant S. G. (2012), **Evolution of synapse complexity and diversity**, Annual Reviews of NeuroSciences 35, 111-131.
- Erbil-Bilir S., Gozuacik D. and Kutlu O. (2017), **Autophagy as a Physiological Response of the Body to Starvation**, Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation. Springer, 1-15.
- Fink J. K. (2000-2014), **Hereditary Spastic Paraplegia overview**, GeneReviews.
- Fraldi A., Klein A., Medina D. L. and Settembre C. (2010), **Brain Disorders Due to Lysosomal Dysfunction**, Annual Reviews of Neurosciences 39, 277-295.
- Freeman C., Seaman M. N.J. and Reid E. (2013), **The hereditary spastic paraplegia protein strumpellin: Characterisation in neurons and of the effect of disease mutations on WASH complex assembly and function**, Biochimica et Biophysica Acta 1832, 160-173.



- Galluzzi L., Baehrecke E. H., Ballabio A., Boya P., Bravo-San Pedro J. M., Cecconi F., Choi A. M., Chu C. T., Codogno P., Colombo M. I., Cuervo A. M., Debnath J., Deretic V., Dikic I., Eskelinen E.-L., Fimia G. M., Fulda S., Gewirtz D. A., Green D. R., Hansen M., Harper J. W., Jäättelä M., Johansen T., Juhasz G., Kimmelman A. C., Kraft C., Ktistakis N. T., Kumar S., Levine B., Lopez-Otin C., Madeo F., Martens S., Martinez J., Melendez A., Mizushima N., Münz C., Murphy L. O., Penninger J. M., Piacentini M., Reggiori F., Rubinsztein D. C., Ryan K. M., Santambrogio L., Scorrano L., Simon A. K., Simon H.-U., Simonsen A., Tavernarakis N., Tooze S. A., Yoshimori T., Yuan J., Yue Z., Zhong Q. and Kroemer G. (2017), **Molecular definitions of autophagy and related processes**, The EMBO Journal 36, 1811-1836.
- Graham J. M. (2001), **Isolation of Lysosomes from Tissues and Cells by Differential and Density Gradient Centrifugation**, Current Protocols in Cell Biology *chapter 3.6*, 1-21.
- Green A. S., Zimmer K.-P., Griffiths G. and Mellman I. (1987), **Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins**, Journal of Cell Biology 105, 1227-1240.
- Greiner-Tollersrud O. K. and Berg T. (2017), **Lysosomal Storage Disorders**, Landes Bioscience (2000-2017).
- Hanna M. C. and Blackstone C. (2009), **Interaction of the SPG21 protein ACP33/masparidin with the aldehyde dehydrogenase ALDH16A1**, Neurogenetics 10, 217-228.
- Harris K. P. and Littleton J. T. (2015), **Transmission, Development, and Plasticity of Synapses**, Genetics 201/2, 345-375.
- Hensiek A., Kirker S. and Reid E. (2015), **Diagnosis, investigation and management of hereditary spastic paraplegia in the era of next-generation sequencing**, Journal of Neurology 262, 1601-1612.
- Higuchi T., Nishikawa J. and Inoue H. (2015), **Sucrose induces vesicle accumulation and autophagy**, Journal of Cell Biochemistry 116, 609-617.
- Hines M. L. and Carnevale N. T. (2001), **NEURON: a tool for neuroscientists**, Neuroscientist 7/2, 123-135.
- Hirst J., Edgar J. R., Esteves T., Darios F., Madeo M., Chang J., Roda R. H., Dürr A., Anheim M., Gellera G., Li J., Züchner F., Mariotti C., Stevanin G., Blackstone C., Kruer S. C. and Robinson M. S. (2015), **Loss of AP-5 results in accumulation of aberrant endolysosomes: defining a new type of lysosomal storage disease**, Human Molecular Genetics 24/7, 4984-4996.
- Hirst J., Itzhak D. N., Antrobus R., Borner G. H. H. and Robinson R. S. (2018), **Role of the AP-5 adaptor protein complex in late endosome-to-Golgi retrieval**, PLoS Biology 16 (1), 1-28.



- Horton A. C. and Ehlers M. D. (2003), **Neuronal polarity and trafficking**, *Neuron* 40, 277-295.
- Hua C. T., Hopwood J. J., Carlsson S. R., Harris R. J. and Meikle P. J. (1998), **Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders**, *Clinical Chemistry* 40/10, 2094-2102.
- Huotari J. and Helenius A. (2011), **Endosome maturation**, *The EMBO Journal* 30, 3481-3500.
- Hurbain I., Geerts W. J. C., Boudier T., Marco S., Verkleij A. J., Marks M. S. and Raposo G. (2008), **Electron tomography of early melanosomes: Implication for melanogenesis and the generation fibrillar amyloid sheets**, *PNAS* 105/50, 19726-19731.
- Hurley J. H. and Young L. N. (2016), **Mecanism of Autophagy Initiation**, *Annual Review of Biochemistry* 86, 1-20.
- Jadot M., Boonen M., Thirion J., Wang N., Xing J., Zhao C., Tannous A., Qian M., Zheng H., Everett J., Moore D., Sleat D. and Lobel P. (2017), **Accounting for protein subcellular localization: a compartmental map of the rat liver proteome**, *Molecular and Cellular proteomics*.
- Jentsch T. J. (2007), **Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters**, *The Physiological Society* 578/3, 633-640.
- Jeyakumar M., Dwek R. A., Butters T. D. and Platt F. M. (2005), **Storage Solutions: Treating Lysosomal Disorders of the Brain**, *Neuroscience* 6, 1-12.
- Jia D., Gomez T., Metlagel Z., Umetani J., Otwinowski Z., Rosen M. and Billadeau D. (2009), **WASH and WAVE actin regulators of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family are controlled by analogous structurally related complexes**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 107, 10442-10447.
- Jiang P. and Mizushima N. (2013), **Autophagy and Human diseases**, *Cell Research* 24, 69-79.
- Jung C. H., Ro S.-H., Cao J., Otto N. M. and Kim D.-H., **mTOR regulation of Autophagy**, *FEBS Letters* 584, 1287-1295.
- Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M., Siegelbaum S. A. and Hudspeth A. J. (2012), **Principle of neural Science**, 5th Edition, McGraww-Hill Education/Medical.
- Karp (2010), **Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments**, 5th Edition, Jonh Wiley & Sons (De Boeck Supérieur).
- Keller P. and Simons K. (1997), **Post-Golgi biosynthetic trafficking**, *Journal of Cell Science* 110, 3001-3009.



- Kirkpatrick L. L. and Brady S. T. (1999), **Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton**, American Society of Neurochemistry and Chapter of « Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. » (Siegel G.J. *et al.*).
- Klumperman J. and Raposo G. (2014), **The Complex Ultrastructure of the Endolysosomal System**, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6/10, 1-22.
- Koike M., Nakanishi H., Saftig P., Ezaki J., Isahara K., Ohsawa Y., Schulz-Schaeffer W., Watanabe T., Waguri S., Kametaka S., Shibata M., Yamamoto K., Kominami E., Peters C., von Figura K. and Uchiyama Y. (2000), **Cathepsin D Deficiency Induces Lysosomal Storage with Ceroid Lipofuscin in Mouse CNS Neurons**, Journal of Neurosciences 20, 6898-6906.
- Kononenko N. L. (2017), **Lysosomes convene to keep the synapse clean**, The Journal of Cell Biology 8/2251, 1-3.
- Kornfeld S. (2010), **A Fascination with Sugars**, Molecular Biology of the Cell 21/22, 3773-3775.
- Kozik P., Francis R. W., Seaman M. N.J. and Robinson M. S. (2010), **A Screen for Endocytic Motifs**, Traffic 11, 843-855.
- Kuech E.-M., Brogden G. and Naim H. Y. (2016), **Alterations in membrane trafficking and pathophysiological implications in lysosomal storage disorders**, Biochimie 130, 152-162.
- Lieberman A. P., Puertollano R., Raben N., Slaugenhaupt S., Walkley S. U. and Ballabio A. (2012), **Autophagy in Lysosomal Storage Disorders**, Autophagy 8/5, 719-730.
- Lo Giudice T., Lombardi F., Santorelli F., Kawarai T. and Orlacchio A. (2014), **Hereditary Spastic Paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms**, Experimental Neurology 261, 518-539.
- Madrigal-Matute J. and Cuervo A. M. (2016), **Regulation of liver metabolism by autophagy**, Gastroenterology 150/2, 328-339.
- Mattera R., Boehm M., Chaudhuri R., Prabhu Y. and Bonifacino J. S. (2010), **Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants**, Journal of Biological Chemistry 286/3, 2022-2030.
- Mattera R., Park S. Y., De Pace R., Guardia C. M. and Bonifacino J. S. (2017), **AP-4 mediates export of ATG9A from the trans-Golgi network to promote autophagosome formation**, PNAS 114/50, 10697-10706.
- Mayor S. and Pagano R. E. (2007), **Pathways of clathrin-independent endocytosis**, Nature Reviews Molecular Cell Biology 8/8, 603-612.



- McCray B. A., Skordalakes E. and Taylor J. P. (2010), **Disease mutation in Rab7 results in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation**, *Human Molecular Genetics* 19/6, 1033-1047.
- McMillan K. J., Korswagen H. C. and Cullen P. J. (2017), **The emerging role of retromer in neuroprotection**, *Current opinion in Cell Biology* 47, 72-82.
- Medina D. L., Di Paola S., Peluso I., Armani A., De Stefani D., Venditti R., Montefusco S., Scotto-Rosato A., Prezioso C., Forrester A., Settembre C., Wang W., Gao Q., Xu H., Sandri M., Rizzuto R., De Matteis M. A. and Ballabio A. (2015), **Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB**, *Nature Cell Biology* 17/3, 288-299.
- Meléndez A. and Levine B. (2009), **Autophagy in C. elegans**, *Wormbook* 24, 1-26.
- Menzies F. M., Fleming A., Caricasole A., Bento C. F., Andrews S. P., Ashkenazi A., Füllgrabe J., Jackson A., Sanchez M. J., Karabiyik C., Licitra F., Ramirez A. L., Pavel M., Puri C., Renna M., Ricketts T., Schlotawa L., Vicinanza M., Won H., Zhu Y., Skidmore J. Rubinsztein D. C. (2017), **Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities**, *Neuron* 93, 1015-1034.
- Metze S., Herzog V. A., Ruepp M.-D. and Mühlemann O. (2013), **Comparison of EJC-enhanced and EJC-independent NMD in human cells reveals two partially redundant degradation pathways**, *RNA Journal* 19, 1432-1448.
- Mindell J. A. (2012), **Lysosomal Acidification Mechanisms**, *Annual Review of Physiology* 74, 69-86.
- Mizushima N., Yamamoto A., Matsui M., Yoshimori T. and Ohsumi Y. (2004), **In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker**, *Molecular Biology of the Cell* 15/3, 1101-1111.
- Mizushima N. (2007), **Autophagy: process and function**, *Genes and Development* 21, 2861-2873.
- Mizushima N. and Komatsu M. (2011), **Autophagy: Renovation of Cells and Tissues**, *Cell* 147, 728-741.
- Möbius W., Ohno-Iwashita Y., van Donselaar E. G., Oorschot V. M., Shimada Y., Fujimoto T., Heijnen H. F., Geuze H. J. and Slot J. W. (2002), **Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O.**, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50/1, 43-55.
- Morfini G.A., Burns M., Binder L.I., Kanaan N.M., LaPointe N., Bosco D.A., Brown R.H., Brown H., Tiwari A., Hayward L., Edgar J., Nave K.A., Garber J., Atagi Y., Song Y., Pigino G. and Brady S.T. (2009), **Axonal transport defects in neurodegenerative diseases**, *Journal of Neurosciences* 41, 12776-12786.



- Moruno-Manchon J. F., Pérez-Jiménez E. and Knecht E. (2013), **Glucose induces autophagy under starvation conditions by a p38 MAPK-dependent pathway**, *Journal of Biochemistry* 449, 497-506.
- Nagle DL., Karim MA., Woolf EA., Holmgren L., Bork P., Misumi DJ., McGrail SH., Dussault BJ., Perou CM., Boissy RE., Duyk GM., Spritz RA. And Moore KJ. (1996), **Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome**, *Nature Genetics* 3, 307-311.
- Nahm M., Lee M.-J., Parkinson W., Lee M., Kim H., Kim Y.-J., Kim S., Cho Y. S., Min B.-M., Bae Y. C., Broadie K. and Lee S. (2013), **Spartin Regulates Synaptic Growth and Neuronal Survival by Inhibiting BMP-Mediated Microtubule Stabilization**, *Neuron* 77/4, 1-25.
- Napolitano G. and Ballabio A. (2016), **TFEB at a glance**, *Journal of Cell Science*, 1-7.
- Neefjes J. and van der Kant R. (2014), **Stuck in traffic: an emerging theme in diseases of the nervous system**, *Trends in Neurosciences* 1029, 1-11.
- Nickless A., Bailis J. M. and You Z. (2017), **Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway**, *Cell and Bioscience* 7/26, 1-12.
- Nixon R. A., Cataldo A. M. and Mathews P. M. (2000), **The Endosomal-Lysosomal System of Neurons in Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Review**, *Neurochemical Research* 25/10, 1161-1172.
- Nixon R. A. and Yang D.-S. (2012), **Autophagy and Neuronal Cell Death in Neurological Disorders**, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012, 1-23.
- Noreau A., Dion P. and Rouleau G. (2014), **Molecular aspects of Hereditary Spastic Paraplegia**, *Experimental Cell Research*.
- Otomo A., Pan L. and Hadano S. (2012), **Dysregulation of the Autophagy-Endolysosomal System in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Related Motor Neuron Diseases**, *Neurology Research International* 2012, 1-12.
- Oz-Levi D., Ben-Zeev B., Ruzzo E. K., Hitomi Y., Gelman A., Pelak K., Anikster Y., Reznik-Wolf H., Bar-Joseph I., Olender T., Alkelai A., Weiss M., Ben-Asher E., Ge D., Shianna K. V., Elazar Z., Goldstein D. B., Pras E. and Lancet D. (2012), **Mutation in TECPR2 Reveals a role for Autophagy in Hereditary Spastic Paraparesis**, *The American Journal of Human Genetics* 91, 1065-1072.
- Palmieri M., Impey S., di Ronza A., Pelz C., Sardiello M. and Ballabio A. (2011), **Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways**, *Human Molecular Genetics* 20/19, 3852-3866.
- Pandey K. N. (2009), **Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors**, *Front. Bioscience* 14, 5339-5360.



- Parenti G., Andria G. and Ballabio A. (2015), **Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy**, Annual Review of Medicine 66, 471-486.
- Parkar N. S., Akpa B. S., Nitsche L. C., Wedgewood L. E., Place A. T., Sverdllov M. S., Chaga O. and Minshall R. D. (2009), **Vesicle Formation and Endocytosis: Function, Machinery, Mechanisms, and Modeling**, Antioxidant and Redox Signaling 11/6, 1301-1312.
- Popova N. V., Deyev I. E. and Petrenko A. G. (2013), **Clathrin-Mediated Endocytosis and Adaptor Proteins**, Acta Naturae 5/3, 62-73.
- Puertollano R., Ferguson S. M., Brugarolas J. and Ballabio A. (2018), **The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization**, The EMBO Journal 37/11, 1-12.
- Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W. C., LaMantia A.-S. and White L. E. (2015), **Neurosciences, 5th Edition**, Sinauer Associates (De Boeck Supérieur).
- Puyal J., Ginet V., Vaslin A., Truttmann A. C. and Clarke P. G.H. (2009), **Les deux visages de l'autophagie dans le système nerveux**, Med. Sci (Paris) 25/4, 383-390.
- Rambold A. S., Cohen S. and Lippincott-Schwartz J. (2015), **Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics**, Development of Cell 32/6, 678-692.
- Renvoisé B., Stadler J., Singh R., Bakowska J. C. and Blackstone C. (2012), **SPG20<sup>-/-</sup> mice reveal multimodal functions for Troyer syndrome protein spartin in lipid droplet maintenance, cytokinesis and BMP signaling**, Human Molecular Genetics 21/16, 3604-3618.
- Renvoisé B., Chang J., Singh R., Yonekawa S., FitzGibbon E. J., Mankodi A., Vanderver A., Schindler A. B., Toro C., Gahl W. A., Mahuran D. J., Blackstone C. and Pierson T. M. (2014), **Lysosomal abnormalities in hereditary spastic paraplegia types SPG15 and SPG11**, Annals of Clinical and Translational Neurology 1/6, 379-389.
- Rinholm J. E. and Bergersen L. H. (2012), **Neuroscience: The wrap that feeds neurons**, Nature 487, 435-436.
- Royle S. J. (2012), **The cellular functions of clathrin**, Cell. Mol. Life Sci. 63/16, 1823-1832.
- Rusten T. E. and Stenmark H. (2010), **p62, an autophagy hero or culprit?**, Nature Cell Biology 12/3, 207-209.
- Rybin V., Ullrich O., Rubino M., Alexandrov K., Simon I., Seabra M. C., Goody R. and Zerial M. (1996), **GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion**, Nature 683/6597, 266-269.



- Sachse M., Ramm G., Strous G. and Klumperman J. (2002), **Endosomes: multipurpose designs for integrating housekeeping and specialized tasks**, *Histochemistry and Cell Biology* 117/2, 91-104.
- Saftig P. and Klumperman J. (2009), **Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function**, *Molecular Cell Biology* 10, 623-635.
- Saheki Y. and De Camilli P. (2012), **Synaptic Vesicle Endocytosis**, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2012, 1-30.
- Samarani M., Loberto N., Soldà G., Straniero L., Asselta R., Duga S., Lunghi G., Zucca F. H., Mauri L., Grazia Ciampa M., Schiumarini D., Bassi R., Giussani P., Chiricozzi E., Prinetti A., Aureli M. and Sonnino S. (2018), **A lysosome-plasma membrane-sphingolipid axis linking lysosomal storage to cell growth arrest**, *The FASEB Journal* (early online)
- Sardiello M., Palmieri M., di Ronza A., Medina D. L., Valenza M., Gennarino V. A., Di Malta C., Donaudy F., Embrione V., Polishchuk R. S., Banfi S., Parenti G., Cattaneo E. and Ballabio A. (2009), **A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function**, *Science* 325/5939, 473-477.
- Schröder B. A., Wrocklage C., Hasilik A. and Saftig P. (2010), **The proteome of lysosomes**, *Proteomics* 10, 4053-4076.
- Schroeder B., Schulze R. J., Weller S. G., Sletten A. C., Casey C. A. and McNiven M. A. (2015), **The Small GTPase Rab7 as a Central Regulator of Hepatocellular Lipophagy**, *Hepatology* 61/6, 1869-1907.
- Schulze R. J., Rasineni K., Weller S. G., Schott M. B., Schroeder B., Casey C. A. and McNiven M. A. (2017), **Ethanol Exposure Inhibits Hepatocyte Lipophagy by Inactivating the Small Guanosine Triphosphatase Rab7**, *Hepatology Communications* 1/2, 140-152.
- Schwarz T. L. (2013), **Mitochondrial Trafficking in Neurons**, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2013, 1-15.
- Seaman M. N.J. (2012), **The retromer complex – endolysosomal protein recycling and beyond**, *Journal of Cell Science* 125, 4693-4702.
- Seaman M. N.J. and Freeman C. L. (2014), **Analysis of the Retromer complex-WASH complex interaction illuminates new avenues to explore in Parkinson disease**, *Communicative and Integrative Biology* 7, 1-5.
- Seranova E., Connolly K. J., Zatyka M., Rosenstock T. R., Barrett T., Tuxworth R. I. and Sarkar S. (2017), **Dysregulation of autophagy as a common mechanism in lysosomal storage diseases**, *Essays in Biochemistry* 61, 733-749.



- Settembre C., Zoncu R., Medina D. L., Vetrini F., Erdin S., Erdin S.U., Huynh T., Ferron M., Karsenty G., Vellard M. C., Facchinetti V., Sebatini D. M. and Ballabio A. (2012), **A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB**, *The EMBO Journal* 31, 1095-1108.
- Settembre C. and Medina D. L. (2015), **TFEB and the CLEAR network**, *Methods in Cell Biology* 126, 45-62.
- Shimazaki H., Honda J., Naoi T., Namekawa M., Nakano I., Yazaki M., Nakamura K., Yoshida K., Ikeda S.-I., Ishiura H., Fukuda Y., Takahashi Y., Goto J., Tsuji S. and Takiyama Y. (2014), **Autosomal-recessive complicated Spastic Paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulator gene mutation**, *Journal of Neurology and Neurosurgery Psychiatry* 85, 1024-1028.
- Simpson M., Cross H., Proukakis C., Pryde A., Hershberger R., Chatonnet A., Patton M. and Crosby A. (2003), **Maspardin is mutated in Mast syndrome, a complicated form of Hereditary Spastic Paraplegia associated with Dementia**, *American Society of Human Genetics* 73, 1147-1156.
- Soderblom C., Stadler J., Jupille H., Blackstone C., Shupliakov O. and Hanna M. (2010), **Targeted disruption of the Mast syndrome gene SPG21 in mice impairs hind limb function and alters axon branching in cultured cortical neurons**, *Neurogenetics* 11, 369-378.
- Solinger J. A. and Spang A. (2012), **Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS**, *FEBS Journal* 280, 2743-2757.
- Solowska J. and Baas P. (2015), **Hereditary Spastic Paraplegia SPG4: what is known and not known about the disease**, *Brain Journal of Neurology* 138, 2471-2484.
- Stavoe A. K.H. and Holzbaur E. L.F. (2018), **Axonal autophagy: Mini-review for autophagy in the CNS**, *Neuroscience Letters March* 2018.
- Steinberg B. E., Huynh K. K., Brodovitch A., Jabs S., Stauber T., Jentsch T. J. and Grinstein S. (2010), **A cation counterflux supports lysosomal acidification**, *Journal of Cell Biology* 189/7, 1171-1186.
- Sun P., Sleat D. E., Lecocq M., Hayman A. R., Jadot M. and Lobel P. (2008), **Acid phosphatase 5 is responsible for removing the mannose-6-phosphate recognition marker from lysosomal proteins**, *PNAS* 105/43, 16590-16595.
- Tanida I., Ueno T. and Kominami E. (2007), **LC3 and Autophagy**, « Autophagosome and Phagosome », 77-88.
- Thoreen C. C., Kang S. A., Chang J. W., Liu Q., Zhang J., Gao Y., Reichling L. J., Sim T., Sabatini D. M. and Gray N. S. (2009), **An ATP-competitive Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Reveals Rapamycin-Resistant Functions of mTORC1**, *The Journal of Biological Chemistry* 284/12, 8023-8032.



- Vantaggiato C., Crimella C., Airoidi G., Polishchuk R., Bonato S., Brighina E., Scarlato M., Musumeci O., Toscano A., Martinuzzi A., Santorelli F. M., Ballabio A., Bresolin N., Clementi E. and Bassi M. A. (2013), **Defective autophagy in spastizin mutated patients with hereditary spastic paraparesis type 15**, *Brain* 136, 3119-3139.
- Wang C.-W. and Klionsky D. (2003), **The Molecular Mechanism of Autophagy**, *Molecular Medicine* 9/4, 65-76.
- Wang T., Ming Z., Xiaochun W. and Hong W. (2011), **Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic**, *Cell Signal.* 23/3, 516-521.
- Ward C., Martinez-Lopez N., Otten E. G., Carroll B., Maetzel D., Singh R., Sarkar S. and Korolchuk V. I. (2016), **Autophagy, Lipophagy and lysosomal lipid storage disorders**, *Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861/4, 269-284.
- Wei Y., Sinha S. C. and Levine B. (2008), **Dual Role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation**, *Autophagy* 4/7, 949-951.
- Weng M. K., Natarajan K., Scholz D., Ivanova V. N., Sachinidis A., Hengstler J. G., Waldmann T. and Leist M. (2014), **Lineage-Specific Regulation of Epigenetic Modifier Genes in Human Liver and Brain**, *PLoS ONE* 9/7, 1-14.
- Winchester B. G. (2001), **Lysosomal membrane proteins**, *European Journal of Pedaitric Neurology* 5, 11-19.
- Wu C.-A., Huang D.-Y. and Lin W.-W. (2014), **Beclin-1-independent autophagy positively regulates internal ribosomal entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  under nutrient deprivation**, *Oncotarget* 5/17, 7525-7539.
- Wu H., Xiong W.C. and Mei L. (2010), **To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly**, *Development* 137/7, 1017-1033.
- Xu H. and Rend D. (2015), **Lysosomal Physiology**, *Annual Reviews of Physiology* 77, 57-80.
- Young J. E., Martinez R. A., La Spada A. R. (2008), **Nutrient Deprivation Induces Neuronal Autophagy and Implicates Reduced Insulin Signaling in Neuroprotective Autophagy Activation**, *The Journal of Biological Chemistry* 284/4, 2363-2373.
- Zeitlmann L., Sirim P., Kremmer E. and Kolanu W. (2001), **Cloning of ACP33 as a Novel Intracellular Ligand of CD4**, *The Journal of Biological Chemistry* 276/12, 9123-9132.



## **ERRATUM**

### **Université de Namur FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR

Téléphone : + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20

E-mail : [joelle.jonet@unamur.be](mailto:joelle.jonet@unamur.be) - <http://www.unamur.be>

### **Localisation subcellulaire et fonction de la maspardine, la protéine déficiente dans la Paraplégie Spastique 21 (SPG21)**

PAUL Melody

#### **Résumé**

Une déficience de la maspardine cause la Paraplégie Spastique 21 (SPG21), ou syndrome de Mast, une forme autosomique récessive compliquée de paraplégie spastique héréditaire. Cette maladie provoque l'apparition de différents symptômes liés à une dégénérescence des neurones corticospinaux, tels qu'une spasticité ou une ataxie.

Des observations réalisées lors d'une étude antérieure ont mis en évidence que cette protéine se localise en partie au niveau des lysosomes dans le foie de rat tout comme cinq autres protéines mutées dans des paraplégies spastiques héréditaires. Plusieurs de ces protéines semblent jouer un rôle dans les fonctions lysosomales, notamment en participant au trafic des récepteurs de transport des hydrolases acides lysosomales. A ce jour, la fonction de la maspardine n'a cependant pas été élucidée.

Afin de contribuer à l'identification de cette fonction, nous avons tout d'abord analysé la localisation subcellulaire de la maspardine dans une lignée de cellules neuronales (SK-N-BE) à l'aide de fractionnements subcellulaire par centrifugation différentielle ou sur gradient de densité de Percoll. Nous avons ensuite évalué l'effet de différents traitements, impactant la morphologie et le fonctionnement normal des lysosomes, sur la localisation de la maspardine et l'expression de son gène, *SPG21*, dans les cellules HeLa. Ces traitements ont consisté, d'une part, à incuber des cellules HeLa avec du saccharose (une molécule qui est endocytée mais non dégradée dans les lysosomes) afin d'induire une surcharge lysosomale et, d'autre part, à soumettre les cellules à une période de jeûne. Pour terminer, nous avons utilisé des clones mutés pour le gène *SPG21* (avec un changement du cadre de lecture au début de l'exon 2) afin d'étudier l'impact de l'absence de maspardine sur l'expression protéique et génique de marqueurs lysosomaux et autophagiques.

Nos résultats montrent que le fractionnement complet par centrifugation différentielle et sur gradient de densité de Percoll permet une séparation efficace des différents compartiments subcellulaires dans les cellules SK-N-BE. En combinant les résultats obtenus par ces deux méthodes, nous déduisons que la maspardine présente une localisation double, cytosolique d'une part et probablement endolysosomale de l'autre.

Lors d'une surcharge lysosomale induite par l'exposition de cellules HeLa à une haute concentration de saccharose, la maspardine semble être recrutée sur les lysosomes car sa population lysosomale augmente au détriment de sa population cytosolique. Le contraire est observable lors d'une période de jeûne. Lors du traitement avec du saccharose, l'expression d'ARNm de quelques marqueurs lysosomaux semble légèrement augmenter mais aucune différence n'est visible pour l'expression de *SPG21*.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la maspardine est une protéine associée à la membrane des lysosomes, notamment dans les cellules neuronales, et que sa présence à ce niveau est modulée par des signaux tels que l'accumulation d'une molécule non dégradée ou la diminution de la disponibilité en nutriments. Il sera intéressant, dans le futur, d'analyser le lien potentiel entre la maspardine et TFEB, qui est un facteur de transcription central dans l'adaptation du métabolisme cellulaire en fonction de la disponibilité en nutriments.

Mémoire de Master 120 en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Août 2018

**Promoteur et Co-promoteur : M. Jadot et M. Boonen**